

**UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP**

**PROGRAMA DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM COXIM  
PLANTAR DE RATOS FRENTE AO TRATAMENTO  
COM ARNICA MONTANA 6CH: IMPORTÂNCIA DAS  
VARIAÇÕES INDIVIDUAIS**

Dissertação apresentado ao Programa de  
Mestrado em Medicina Veterinária da  
Universidade Paulista – UNIP para obtenção  
do título de mestre em Medicina Veterinária.

**ANA PAULA KAWAKAMI**

**SÃO PAULO  
2009**

**UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP**

**PROGRAMA DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM COXIM  
PLANTAR DE RATOS FRENTE AO TRATAMENTO COM  
*ARNICA MONTANA 6CH: IMPORTÂNCIA DAS  
VARIAÇÕES INDIVIDUAIS***

Dissertação apresentado ao Programa de Mestrado em Medicina Veterinária da Universidade Paulista – UNIP para obtenção do título de mestre em Medica Veterinária, sob orientação do Prof(a). Dr(a). Leoni Villano Bonamin

**ANA PAULA KAWAKAMI**

**SÃO PAULO  
2009**

Aos meus pais que me permitiram, com muito esforço, empenho e dedicação, concluir uma fase tão importante em minha vida, sempre me guiando para me tornar uma pessoa cada vez melhor.  
Aos amigos e familiares pelo apoio e paciência durante toda essa fase de estudos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a minha eterna orientadora Prof. Dra. Leoni Villano Bonamin por ter me estendido a mão na hora em que eu mais precisava, pela paciência, pelos conselhos, pela disponibilidade irrestrita e por me ensinar a ver a vida de uma forma diferente. Sou sua fã!

Ao meu paizão Paulo, pelo seu amor incondicional e por seus esforços imensos para que eu sempre conquiste os meus sonhos.

À minha mãe Marlene por me ajudar nas horas mais difíceis, principalmente com aquele almoço reforçado, com aquela atenção que só mãe pode dar.

À minha avó Takeko, pelas eternas conversas estimuladoras na hora do almoço. *Te amo “batchan”!*

Ao meu irmão Koiti, por me agüentar diariamente bem quietinho e por me ajudar a montar os gráficos.

À minha família linda e essencial que está sempre presente na minha vida.

À minha amiga Lika que sempre me ajuda no trabalho diário, que tanto me acalma nos momentos de desespero e que me incentiva a seguir sempre em frente.

Aos meus melhores amigos: Dinho e Danilo por me socorrerem nas horas mais estressantes.

À minha prima Célia por toda cumplicidade nesses anos de convívio.

À minha amiga Fernanda pelos momentos de descontração.

À Juliana e à Roberta pelos “papers” e “e-mails”.

A todos do laboratório que riram e choraram comigo: Cleide, Suzana, Renata, Tatiana e Graziela.

Ao Prof. Dr. José Barbosa pelos seus conhecimentos e paciência.

Ao Paulo Ailton Valdovato pela ajuda técnica e paciência.

À farmácia Sensitiva por fornecer os medicamentos utilizados neste projeto.

Às secretárias Andrea Haluli e Fernanda Kappa pelo apoio constante nos trabalhos administrativos.

À FAPESP (processo No 07/59661-5) e a CAPES pelo suporte financeiro.

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1</b> – Fotomicrografia de corte histológico de coxim de mastócitos subcutâneos degranulados e não degranulados..... | 34 |
| <b>Figura 2</b> – Edema medido por micrometria (mm) nos diferentes grupos e subgrupos experimentais.....                       | 46 |
| <b>Figura 3</b> – Porcentagem de mastócitos degranulados nos diferentes grupos e sub-grupos experimentais.....                 | 47 |
| <b>Figura 4</b> – Diâmetro médio de vasos linfáticos por corte.....  | 48 |
| <b>Figura 5</b> – Total de células PMN por campo nos diferentes grupos experimentais.....                                      | 49 |
| <b>Figura 6</b> – Total de células marcadas por campo pelo MAC387 e CD163 nos diferentes grupos experimentais.....             | 50 |
| <b>Figura 7</b> – Total de células marcadas para CD3 e para CD45 nos diferentes grupos experimentais.....                      | 52 |
| <b>Figura 8</b> – Total de células marcadas para CD18 e para CD54 nos diferentes grupos experimentais.....                     | 54 |

## LISTA DE QUADROS

|  |    |
|--|----|
| <b>Quadro 1 – Grupos e subgrupos experimentais.....</b>  | 36 |
| <b>Quadro 2 – Marcadores utilizados na imuno-histoquímica .....</b>                                      | 39 |
| <b>Quadro 3 – Critérios de intensidade de marcação de células endoteliais para o marcador CD54 .....</b> | 41 |

## LISTA DE ANEXOS

**Anexo 1 – Certificado do comitê de ética..... 81**

**Anexo 2 – Média e desvio padrão dos diferentes sub-grupos..... 83**

## LISTA DE ABREVIATURAS

PMN - Células polimorfonucleares

CH ou C – Diluição centesimal Hahneanniana

CD – *Cluster of differentiation*

HE – Hematoxilina-Eosina

UHD – ultradiluições

PV – Peso vivo

PBS – Tampão fosfato

NO – óxido nítrico

## RESUMO

### **MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM COXIM PLANTAR DE RATOS FRENTE AO TRATAMENTO COM ARNICA MONTANA 6CH: IMPORTÂNCIA DAS VARIAÇÕES INDIVIDUAIS.** Ana Paula Kawakami.

O presente trabalho visa demonstrar a ação da *Arnica montana* 6CH sobre a modulação do edema, da dinâmica vascular e da migração celular na reação inflamatória aguda em ratos, com ênfase nas variações individuais. Ratos Wistar machos e adultos foram submetidos à inoculação subcutânea plantar de carragenina 1% e tratados com *Arnica montana* 6CH, dexametasona (4,0 mg/kg) ou solução hidro-alcoólica 5% (controle), por via oral (10 $\mu$ L/100g), a cada 15 minutos, entre 30 e 180 minutos após a inoculação da carragenina. Ao final do tratamento, os animais foram sacrificados e o tecido subcutâneo da pata inoculada foi coletado para exame histopatológico e utilização de métodos imuno-histoquímicos para identificação e quantificação dos seguintes marcadores: CD3, CD45RA, CD18, CD163, CD54 e MAC 387. O tratamento estatístico dos dados incluiu a classificação dos 20 animais de cada grupo experimental em dois subgrupos: 10 ratos que apresentaram edema precoce e 10 animais que apresentaram edema tardio antes do início dos tratamentos. Os animais que manifestaram edema precoce foram menos responsivos à *Arnica montana* 6CH em relação àqueles que fizeram edema tardio, pois não apresentaram diferenças em relação ao grupo controle quanto a maior parte dos parâmetros estudados, embora apresentassem maior porcentagem de mastócitos degranulados ( $p=0,0001$ ) e maior expressão de CD54 ( $p=0,03$ ). Os ratos que manifestaram edema tardio foram mais responsivos à *Arnica montana* 6CH, ou seja: apresentaram menor intensidade de edema ( $p=0,01$ ), menor porcentagem de degranulação de mastócitos ( $p=0,0001$ ) e maior diâmetro de vasos linfáticos ( $p=0,05$ ) em relação ao controle. Não houve diferenças significativas quanto à contagem diferencial de células inflamatórias entre grupos e subgrupos. Conclui-se que os efeitos da *Arnica montana* 6CH sobre a fisiopatologia do processo inflamatório agudo em ratos são relevantes quando se considera a absorção do edema e podem variar de acordo com as características individuais.

## ABSTRACT

### **MODULATION OF INFLAMMATORY RESPONSE IN RAT FOOTPAD AFTER TREATMENT WITH ARNICA MONTANA 6CH: RELEVANCE OF INDIVIDUAL VARIATIONS.** Ana Paula Kawakami.

The aim of this study is to demonstrate the effects of *Arnica montana* 6CH on the modulation of edema, vascular dynamics and cell migration in acute inflammatory response in rats, stressing the influence of individual variations in the process. Adult male Wistar rats were submitted to subcutaneous inoculation of 1% carrageenan into the footpad and treated with *Arnica montana* 6CH, dexamethasone (4.0 mg/kg) or 5% hydro-alcoholic solution (control), *per os* (10 $\mu$ L/100g), each 15 minutes, between 30 and 180 minutes after irritant inoculation. After this period, animals were killed and the pad subcutaneous tissue was harvested for histopathological examination and immunohistochemistry procedures, in order to identify and quantify the following cell markers: CD3, CD45RA, CD18, CD163, CD54 e MAC 387. The statistical treatment of data included the classification of animals of each group (N=20) in two subgroups: 10 rats that presented precocious edema and 10 rats that presented late edema, before the beginning of treatments. The animals that presented precocious edema were less responsible to *Arnica montana* 6CH in relation to those that showed late edema, since they did not present differences of the main parameters evaluated in relation to control, although higher percentage of degranulated mast cells ( $p=0.0001$ ) and higher expression of CD54 ( $p=0.03$ ) could be seen. Instead, rats that presented late edema were more responsible to *Arnica montana* 6CH, since they presented less intense edema ( $p=0.01$ ), lower percentage of mast cell degranulation ( $p=0.0001$ ) and increase in lymphatic vessels diameter ( $p=0.05$ ) in relation to control. No differences among groups and subgroups were found in relation to cell counting, using the different markers. In conclusion, the effects of *Arnica montana* 6CH upon acute inflammatory process physiopathology in rats are relevant in relation to edema absorption and can vary according to individual characteristics.

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 – Introdução.....</b>   | <b>13</b> |
| <b>2 – Revisão bibliográfica.....</b>  | <b>18</b> |
| <b>2.1 – Homeopatia.....</b>   | <b>18</b> |
| <b>2.2 – A planta - <i>Arnica montana</i>.....</b>                                   | <b>21</b> |
| <b>2.3 – Imuno-histoquímica.....</b>   | <b>25</b> |
| <b>2.4 – Marcadores utilizados.....</b>  | <b>26</b> |
| <b>3 – Objetivo.....</b>   | <b>31</b> |
| <b>4 – Materiais e métodos.....</b>  | <b>32</b> |
| <b>4.1 – Animais.....</b>  | <b>32</b> |
| <b>4.2 – Indução e avaliação do processo inflamatório agudo por carragenina.....</b> | <b>32</b> |
| <b>4.3 – Tratamento.....</b>   | <b>34</b> |
| <b>4.4 – Tratamento dos dados.....</b>   | <b>35</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.5 – Avaliação imuno-histoquímica.....       | 37        |
| 4.5.1 – Preparação das lâminas.....           | 37        |
| 4.5.2 – Desparafinização dos cortes.....      | 37        |
| 4.5.3 – Imuno-histoquímica.....               | 37        |
| 4.5.4 – Quantificação.....                    | 40        |
| 4.6 – Análise estatística dos resultados..... | 43        |
| 4.7 – Critérios de bioética.....              | 43        |
| 4.8 – Conflito de interesses.....             | 43        |
| <b>5 – Resultados.....</b>                    | <b>44</b> |
| <b>6 – Discussão.....</b>                     | <b>55</b> |
| <b>7 – Conclusão.....</b>                     | <b>63</b> |
| <b>8 – Referências bibliográficas.....</b>    | <b>64</b> |

## 1- INTRODUÇÃO

Questionamentos acerca da probabilidade de pacientes se recuperarem frente a injúrias, de efeitos colaterais de medicamentos e da complexidade da utilização de determinada terapia, dentre outros tantos, são rotineiros para os profissionais da saúde. Dados obtidos apenas a partir de pesquisas clínicas não são suficientes para que uma terapia possa ser empregada em uma população – humana ou animal –, pois aspectos relacionados aos mecanismos de ação biológica celular, molecular e organizacional são importantes para se determinar o alcance de cada tratamento.

Devido a este fato, a comunidade médica procura por informações demonstradas através de estudos experimentais – com base nestes achados, as terapias se tornam confiáveis e passíveis de serem utilizadas no cotidiano da clínica médica. Isto se faz valer em especial para a Homeopatia, dado seu caráter polêmico e a escassez de material bibliográfico acerca do assunto.

Nos últimos anos, tem sido crescente a adesão de veterinários e agrônomos ao uso de preparações homeopáticas como ferramenta zootécnica e fitotécnica (BERCHIERI *et al.*, 2006; RAJKUMAR *et al.*, 2006; SATO, 2008). Contudo, boa parte dos estudos experimentais sobre o tema não considera alguns conceitos básicos da homeopatia (SHANG *et al.*, 2005), o que gera grande dificuldade de interpretar resultados. A rigor, tais conceitos deveriam ser o principal foco das

pesquisas sobre o tema, pois são eles que carecem verdadeiramente de demonstração e não apenas a presença ou não de efeito biológico.

A terapia homeopática necessita de comparação entre sintomas apresentados pelo paciente e aqueles observados em experimentações patogenéticas, o que possibilita a escolha precisa da substância a ser utilizada, segundo o princípio da Similitude Hahnemanniana. Dessa forma, a idiossincrasia entre o animal tratado e o medicamento prescrito é considerada a chave do sucesso terapêutico. Modelos experimentais que coloquem essa assertiva em foco são, portanto, necessários (ARAÚJO-PRADO NETO *et al.*, 2004; COELHO *et al.*, 2006; ROCHA *et al.*, 2008).

Todo o arsenal terapêutico homeopático é derivado da experimentação no homem sô. A um grupo de pessoas sadias é administrada determinada substância (geralmente dinamizada), sendo anotados todos os seus sintomas (mentais, físicos e emocionais). A lista dos sintomas agrupados é chamada de patogenesia da substância testada. Os livros que reúnem as patogenesias de inúmeras substâncias são chamados de "Matéria Médica" (ROSENBAUM, 1998).

Além deste, outro pressuposto deve ser igualmente observado: o das doses Infinitesimais, que preconiza que a substância originária do medicamento deva ser submetida a diluições centesimais seriadas, seguidas de cem sucussões, para que seu potencial terapêutico seja despertado (BENITES, 2002). Reside neste último princípio o cerne

das polêmicas sobre Homeopatia, uma vez que muitas destas diluições ultrapassam o número de Avogadro – são as chamadas UHD (*ultra high dilutions*).

Visando este aspecto, estudos em biofísica têm apontado para a existência de modificações nas propriedades físico-químicas do solvente determinadas pelo soluto altamente diluído (ENDLER *et al.*, 1994, 1995, 1997, 2003; DEL GIUDICE, 1994; DEL GIUDICE; PREPARATA, 1998; LOBYSHEV *et al.*, 1999, 2000; REY, 2003; MIRANDA, 2008). Da mesma forma, relatos sobre os efeitos dos preparados homeopáticos em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* (DAVENAS *et al.*, 1987; YOUBICIER-SIMO *et al.*, 1997; BONAMIN *et al.*, 2001; LORENZ *et al.*, 2003; BELON *et al.*, 2004; SAINTE-LAUDY; BELON, 2006; SANTOS *et al.*, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2008; PINTO *et al.*, 2008) têm aberto novos caminhos para essa área de pesquisa emergente (BONAMIN, 2005; 2008).

Dentre os modelos biológicos clássicos em pesquisa homeopática, destacam-se os descritos por CRISTEA e colaboradores (1997a e 1997b). Em CRISTEA *et al.*, 1997a, observam-se diferenças quantitativas e qualitativas importantes entre a dinâmica de compostos dinamizados (diluídos e submetidos à sucussão) e não-dinamizados (diluídos apenas): em diluições idênticas, as preparações dinamizadas de Belladonna apresentaram efeitos biológicos mais intensos que as não dinamizadas, os quais permanecem mensuráveis mesmo quando em diluições acima de 12C – que, de acordo com a Lei de Avogadro, não teriam mais quaisquer moléculas da substância ativa. Portanto, as

diluições dinamizadas teriam efeitos biológicos específicos, mas seriam dependentes de succussão. Em outro trabalho, em que se estudaram os efeitos das diferentes potências homeopáticas de *Chamomilla* na atividade geral de ratos, CRISTEA e colaboradores (1997b) desenharam um modelo experimental no qual a idiossincrasia de cada animal foi considerada como fator de inclusão. Assim, ratos com maior atividade geral basal responderam com maior magnitude ao tratamento com *Chamomilla* dinamizada, respeitando-se o princípio da similitude.

No universo prático, o fator “individualidade” deve ser considerado ao se organizar um desenho experimental. Isso é o que se busca fazer neste trabalho, cuja proposta é a de esclarecer o papel da *Arnica montana* 6CH nos mecanismos de regulação do edema e da migração de células inflamatórias, dando seqüência a uma série de pesquisas realizadas sobre o tema (CAMPBELL, 1976; HALL, 1980; HALL *et al.*, 1985; MICHAUD, 1987; CARVALHO, 2000; CARVALHO; BONAMIN, 2001; FERRARI; BONAMIN, 2006; BONAMIN, 2007, BONAMIN, 2008).

Sabe-se que a *Arnica montana* apresenta importante atividade no controle da inflamação em ratos através de efeitos modulatórios, por vezes aparentemente contraditórios, tendo em vista a redução do calibre venular e aumento da reabsorção linfática em concomitância com o aumento do preenchimento capilar e do fluxo sanguíneo (efeito “rubifaciente”) no processo inflamatório subcutâneo. Também o tempo de permanência de células polimorfonucleares foi prolongado de uma

para quatro horas sob ação da *Arnica montana* 6CH, no modelo da pleurisia experimental (CARVALHO, 2000; CARVALHO; BONAMIN, 2001; BITTENCOURT *et al.*, 2002; MACEDO *et al.*, 2004; FERRARI; BONAMIN, 2006; BONAMIN, 2008).

O que se está por determinar ainda, no entanto, é como a atividade dos preparados homeopáticos deste vegetal está ligada à modulação da migração de células inflamatórias ao sítio de lesão e do efeito facilitador da reabsorção do líquido edematoso (BONAMIN *et al.*, 2000; BITTENCOURT *et al.*, 2002; FERRARI; BONAMIN, 2006; BONAMIN, 2008).

Assim sendo, o objetivo do trabalho é testar as seguintes hipóteses: a) se, dentre os inúmeros efeitos terapêuticos da *Arnica montana* 6CH, haveria a possibilidade desta induzir alterações seletivas no recrutamento de linfócitos B e T, neutrófilos e monócitos, com prováveis oscilações na expressão de moléculas de adesão relacionadas ao processo inflamatório agudo; b) se as variações individuais pudessem interferir na eficácia do tratamento, tendo em vista a dinâmica vascular e a reabsorção do edema inflamatório.

## 2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1- Homeopatia

A palavra homeopatia é originária do grego e significa “semelhante à doença”.

A terapêutica homeopática iniciou-se como uma abordagem experimental em 1796 através de Christian Frederick Samuel Hahnemann (1755 – 1843), considerado pai da homeopatia. Hahnemann estudando os “aforismos” de Hipócrates (460 – 350 a.C.) retoma o conceito de similitude, ou seja: o de que uma determinada substância capaz de provocar sintomas no organismo poderia tratar tais sintomas no paciente que o apresentasse, ou seja, exercer efeitos antagônicos em sistemas biológicos (REBER *et al.*, 1996; ERNEST, PITTLER, 1998).

Tentando aplicar este achado de uma maneira sistemática e terapêutica, Hahnemann familiarizado com muitos sintomas causados por agentes tóxicos e, ciente do fato de que muitas doenças apresentavam sintomas similares aos de uma intoxicação, testou pequenas doses de *Arsênico* em pacientes com cólera, já que a intoxicação causada por este mineral resulta em características muito semelhantes a esta doença (BELLAVITE, 2005).

Aos poucos, Hahnemann descobriu que outras doenças além da cólera poderiam ser tratadas com pequenas doses de arsênico desde

que apresentassem características semelhantes a este remédio. Entretanto, nem todos os pacientes com cólera respondiam ao arsênico, ou seja, era necessário utilizar outro medicamento que dependia dos sintomas individuais. Dessa forma, Hahnemann concluiu que a cura permanente só poderia ser alcançada quando o medicamento utilizado fosse escolhido com bases nas características constitucionais e fisiológicas do paciente, tão bem como as da doença (BELLAVITE, 2005).

A primeira menção feita com relação a este princípio foi encontrada num papiro datado de 1500 a.C., mas este era aplicado de maneira muito subjetiva e não por meio de observações de sintomas causados no organismo (CORRÊA *et al.*, 1997).

Hahnemann trabalhando como tradutor teve em suas mãos, além das obras de Hipócrates, a obra de Cullen, em 1790. Neste trabalho, Cullen descrevia as propriedades da *Cinchona officinalis*, ou quinina, também chamada quina (nativa do Peru), utilizada no tratamento da malária. Apesar de Cullen atribuir os mecanismos de ação da quinina através do fortalecimento do estômago, por uma substância contrária a febre, Hahnemann começou a questionar essas informações (BENEZ *et al.*, 2004).

Ele percebeu que o uso abusivo da quinina causava nas pessoas sintomas parecidos com a malária (enfermidade natural). Hahnemann passa a experimentar em si mesmo a quinina, provocando os sintomas do estado febril (BENEZ *et al.*, 2004).

No entanto, a terapia homeopática necessita de comparação entre sintomas apresentados pelo paciente e aqueles observados em experimentações medicamentosas, segundo a Lei de Similitude Hahnemanniana (ARAÚJO-PRADO NETO *et al.*, 2004; COELHO *et al.*, 2006).

Além deste, outro pressuposto deve ser igualmente observado: o das Doses Infinitesimais, que preconiza que a substância originária do medicamento deva ser submetida a diluições centesimais seriadas, seguidas de cem sucussões, para que seu potencial terapêutico seja despertado (BENITES, 2002). Reside neste último princípio o cerne das polêmicas sobre Homeopatia, uma vez que muitas destas diluições ultrapassam o número de Avogadro – são as chamadas UHD (*ultra high dilutions*).

Estudos desenvolvidos em fins da década de 1980 por DAVENAS *et al.* (1987) e publicados no *European Journal of Pharmacology* já demonstravam claras evidências acerca dos efeitos das ultradiluições. Nestes experimentos, observou-se que a *Silicea* (sílica ultradiluída) era capaz de reduzir em até 61% a atividade de macrófagos peritoneais de camundongos.

Em 2001, BONAMIN e colaboradores demonstraram que a dexametasona, em preparações UHD, bloqueava a atividade farmacológica da própria dexametasona alopatíca (dose de 4mg/kg),

em diversos modelos experimentais desenvolvidos em camundongos BALB/c.

Talvez o mais contundente estudo que demonstra a existência de efeitos biológicos das ultradiluições seja aquele publicado em 2004 e 2006 por BELON, SAINTE-LAUDY e colaboradores. Neste experimento multicêntrico, conduzido em cego, constatou-se que ultradiluições de histamina bloqueavam a degranulação de basófilos *in vitro*, com alto grau de significância (BELON *et al.*, 2004, 2006). Este experimento foi reproduzido por outro laboratório independente, um ano antes (LORENZ *et al.*, 2003).

## **2.2- A Planta – *Arnica montana***

A *Arnica montana* é uma dicotiledônea perene, nativa das regiões montanhosas de solo ácido do leste e centro europeus, pertencente à família Asteracea, antes nomeada Compositae (MACEDO *et al.*, 2004). Este vegetal possui em sua composição química substâncias farmacologicamente ativas de grande importância terapêutica, quais sejam: (1) flavonóides (queracetina e seus derivados, como queracetina-3-monoglicosídeo e ácido queracetina-3-glicogalacturônico); (2) lactonas sesquiterpênicas (arnicolida, helenalina e 11 $\alpha$ ,13-diidro-helenalina); (3) álcoois (arnidiol, arnilenediol e isoarnilenediol); (4) carotenóides; (5) óleos essenciais; (6) inulina; e (7) taninas (SCHIMIDT *et al.*, 1993; BUCAY, 1995; LYSS *et al.*, 1997; MACEDO *et al.*, 2004). SCHIMIDT *et al.* (2002) investigaram a atividade anti-*Trypanosoma brucei rhodesiense* e *T. cruzi* americano de seis

lactonas sesquiterpênicas ativas na *Arnica*: helenalina; mexicanina I; 11 $\alpha$ ,13-diidro-helenalina; chamissonolida; ivalina; e isoalantolactona. Todos se mostraram eficazes contra ambos os parasitos, sendo a helenalina a substância que mais se destacou.

JÄGGI *et al.* (2004) verificaram que um composto fitoterápico contendo *Arnica montana*, *Sanguinaria canadensis*, *Rhus toxicodendron* e *Solanum dulcamara* – assim como a maioria destes compostos quando utilizados individualmente – foram capazes de inibir a produção de leucotrienos pela enzima LOX-5 em modelo celular e também se mostraram eficazes nos testes de síntese de prostaglandinas com isolamento de COX-1 e COX-2. A *Arnica montana* apresentou atividade inibitória satisfatória não somente quando administrada juntamente dos outros vegetais, como também quando usada em separado.

Além do uso antiinflamatório, outras atividades da *Arnica montana* foram descritas: (1) anti-neoplásica (ROBLES *et al.*, 1995); (2) analgésica (GENET, 1980; RIGAMONTI, 1995); (3) anti-ulcerativa (ROBLES *et al.*, 1995); (4) cardiotônica, vasodilatadora e anti-hipertensiva (ROBLES *et al.*, 1995); (5) anti-cefaléica (ROBLES *et al.*, 1995); (6) anti-hemorrágica (CHAKRABARTI, 1991); e (7) promoção da mineralização óssea e ação anti-lipidêmica (HALL *et al.*, 1985).

A *Arnica montana* tem na helenalina e em seus ésteres sua principal ação medicamentosa. HALL *et al.* (1980) estudaram os efeitos de concentrações micromolares (100 $\mu$ M) destes componentes no tumor

de Erlich e em cultura de células leucêmicas da linhagem P338, verificando efeito citotóxico sobre as células tumorais, quer modificando a síntese de DNA, quer inibindo enzimas importantes das vias metabólicas da glicose.

KLASS *et al.* (2002) também demonstrou tal atividade em culturas de células T Jurkat: preparados fitofarmacêuticos de flores da *Arnica montana* inibem a ativação dos fatores de transcrição inflamatórios NF- $\kappa\beta$  e NF-AT e a liberação das citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  – ações correlacionadas quantitativa e qualitativamente ao conteúdo de lactonas sesquiterpênicas presentes no exemplar do vegetal utilizado.

Devido à presença destas substâncias, a ingestão acidental de *Arnica montana* pode provocar vasodilatação, estase sanguínea e aumento da permeabilidade capilar, por danificar a membrana endotelial vascular e romper a continuidade tissular – permitindo a passagem dos elementos figurados séricos para o interstício –, o que explica as hemorragias causadas por ela em situações de exposição a doses tóxicas. No tecido muscular, pode induzir dor e rigidez similares aos efeitos da acumulação lática ocorrida após exercício físico exacerbado. O vegetal também é capaz de afetar o sistema nervoso central e autônomo simpático, levando à paralisia. Além disso, o contato epitelial com a planta pode causar inflamação local severa, erupções vesiculares e pústulas eritematosas (MACEDO *et al.*, 2004).

De acordo com a Lei de Similitude, como já citado, uma determinada substância capaz de provocar sintoma específico no organismo animal

poderia tratar tal sintoma no paciente que o apresentasse, ou seja, exercer efeitos antagônicos em sistemas biológicos, dependendo da diluição utilizada (REBER *et al.*, 1996; ERNST & PITTLER, 1998).

ERNST & PITTLER (1998) realizaram revisão sistemática sobre os efeitos da *Arnica montana* homeopática na inflamação aguda, concluindo não haver evidências de efeitos da *Arnica* que fossem diferentes daqueles observados mediante uso de placebo. Segundo afirmam, tais experimentos teriam falhado devido a várias limitações metodológicas. O número reduzido de amostras seria o problema principal; ou ainda, a *Arnica* poderia ter sido utilizada erroneamente, de forma generalizada e não tratando uma condição específica individual.

De fato, em outro ensaio clínico placebo-controlado, demonstrou-se não haver efeito específico da *Arnica montana* 30CH na recuperação de dores decorrentes do esforço físico, quando comparado ao grupo placebo (JAWARA *et al.*, 1997). Da mesma forma, HART e colaboradores (1997) não obtiveram resultados que diferenciassem a redução da dor pós-histerectomia, comparando-se um grupo de nove pacientes que receberam *Arnica montana* 30CH e 11 pacientes aos quais foi administrado placebo.

Por outro lado, ALBERTINI & GOLDBERG (1984) dividiram 60 pacientes com nevralgia dentária em dois grupos: um (experimental) recebeu *Arnica montana* associada a *Hypericum* sp como tratamento e ao outro (controle) administrou-se placebo. Como resultado, 23

indivíduos do primeiro montante apresentaram redução da nevralgia frente a somente 12 pacientes pertencentes ao grupo placebo.

Além de ensaios clínicos, recentemente, estudos sobre o uso agronômico da *Arnica montana* têm despontado na literatura. BONFIM *et al.* (2008) demonstraram que rosas (*Rosemarinus officinalis* L.) e ervas-cidreira (*Lippia alba* Mill) quando tratadas com *Arnica montana* nas diluições 3CH, 6CH e 12CH apresentam um aumento na porcentagem e na qualidade das raízes, ou seja, *Arnica montana* apresenta um efeito estimulatório eficaz que pode ser empregado na propagação dessas espécies.

### **2.3- Imuno-histoquímica**

Imuno-histoquímica é uma técnica que utiliza anticorpos marcados como reagentes específicos para localizar constituintes teciduais (antígenos) *in situ*. Sua prática iniciou-se em 1941 através de Albert H. Coons que marcou um anticorpo com corante fluorescente para identificar um antígeno num corte tecidual. Essa prática é conhecida como método direto de imunofluorescência, pois utiliza um anticorpo específico conjugado a um isoftiocianeto fluorescente (FITC) (POLAK *et al.*, 1987).

Ao longo dos anos essa técnica foi aperfeiçoada com a descoberta de novos anticorpos, de diferentes marcadores e do método indireto. Neste método, o anticorpo primário não está conjugado, mas uma segunda camada de anticorpos, feita a partir da produção de  $\gamma\alpha\mu\alpha$ -

globulinas reativas contra imunoglobulinas das espécies doadoras do anticorpo primário, é adicionada e conjugada ao marcador.

## 2.4- Marcadores utilizados

### CD 54:

É uma proteína de superfície de 90kD conhecida também como ICAM-1 (molécula de adesão intracelular – 1), pertencente à superfamília das imunoglobulinas. O anticorpo primário anti-CD54, portanto, reconhece a molécula de adesão (ICAM-1) na superfície celular (ETIENNE *et al.*, 2000). Em tecidos normais, a densidade de antígeno CD54 é mais elevada no endotélio e é aumentada por fatores como a exposição a citocinas, inflamação, e transformação neoplásica. O antígeno é fortemente expresso em macrófagos e em linfócitos B do centro germinativo em tecidos linfóides. No sangue periférico, o antígeno CD54 é fracamente expresso em leucócitos, exceto quando ativados por mitógenos. O antígeno CD54 é também induzível em fibroblastos, células epiteliais e células endoteliais (ETIENNE *et al.*, 2000).

Sob uma abordagem terapêutica, demonstrou-se que nos casos de mieloma múltiplo humano, linfoma e melanoma, o anticorpo anti-CD54 humano foi altamente efetivo no retardo de crescimento de tumores prolongando a sobrevida dos pacientes (BROOKS *et al.*, 2008).

### CD45RA:

É um marcador de membrana encontrado na superfície de linfócitos B.

O clone do anticorpo monoclonal utilizado - OX-33 - marca somente células B entre os linfócitos do ducto torácico, com pouca marcação em medula óssea e nenhuma marcação em timócitos (BARCLAY *et al.*, 1987).

### **CD18:**

É uma integrina de cadeia-β2, de 95 kDa, que forma heterodímeros não covalentemente ligados com subunidades alfa de integrina: CD11a, CD11b e CD11c ( $\alpha L$  – (LFA-1),  $\alpha M$  - (Mac-1) e  $\alpha X$ , respectivamente). O CD18 é expresso por todos os leucócitos, plaquetas ativadas e linhagem de células megacariocíticas. Sabe-se que as integrinas participamativamente do processo de adesões celulares.

Estudos realizados por YILMAZ e colaboradores (2008) demonstraram uma importante contribuição das integrinas-β2 (CD11/CD18), moléculas de adesão e P-selectina no recrutamento de leucócitos, bem como plaquetas na microvasculatura pós-isquêmica cerebral. O imunobloqueio ou a deleção genética destas moléculas de aderência reduziu o volume do infarto, o edema, os déficits comportamentais e / ou mortalidade em diferentes modelos animais de isquemia cerebral.

### **CD163:**

É uma glicoproteína de membrana plasmática de 175kD conhecida também como ED2. É membro da superfamília B de receptores scavenger, ricos em cisteína (SRCR), e que são altamente expressos em macrófagos residentes.

Macrófagos teciduais maduros formam a primeira linha de defesa para reconhecimento e eliminação de patógenos potenciais. CD163 é expresso na maioria de subpopulações de macrófagos teciduais maduros. CD163 atua como um receptor de complexos hemoglobina-haptoglobina, medeia as interações entre célula-célula e macrófagos e atua no desenvolvimento de eritroblastos em ilhas eritroblásticas. Além disso, CD163 pode funcionar como um receptor de macrófagos para bactérias tanto gram-positivas quanto gram-negativas (FABRIEK *et al.*, 2008). Estes achados sugerem que, durante a infecção bacteriana, o CD163 expresso em macrófagos teciduais atua como um sensor imune inato e indutor de inflamação local (FABRIEK *et al.*, 2005; 2008).

CD163 é expresso por aproximadamente 50% dos macrófagos peritoneais, um sítio de macrófagos esplênicos, e por macrófagos de outros tecidos. Entretanto, não é expresso por monócitos, macrófagos alveolares ou células da microglia (WHITELAND *et al.*, 1995).

### **MAC387:**

É uma proteína citoplasmática composta de uma cadeia alfa de 12kD e uma cadeia beta de 14kD expressa por granulócitos, monócitos e por macrófagos teciduais.

Macrófagos são compostos de muitas formas de fagócitos mononucleares encontrados em tecidos. Fagócitos mononucleares originam-se de células tronco hematopoiéticas na medula óssea.

Passam de monoblastos para pró-monócitos, e destes para monócitos, onde entram no sangue e circulam por aproximadamente 40 horas. Após entrada nos tecidos apresentam algumas funções aumentadas como, por exemplo, tamanho, atividade fagocitária, e conteúdo enzimático lisossomal assim tornando-se macrófagos. Embora as funções dos macrófagos sejam fagocitose e pinocitose não específica, a fagocitose específica de microrganismos opsonizados mediados por receptores Fc e receptores complemento permite a destruição do microrganismo ingerido e a apresentação dos抗ígenos aos linfócitos T e B.

Nesse processo, há secreção de uma grande variedade de produtos, incluindo as enzimas lisosimas e colagenases, e muitas outras moléculas reguladoras (ex. Interferon, Interleucina 1). As células que são reconhecidas como macrófagos são histiocitos, células de Kupffer, osteoclastos, células microgliais, células sinoviais do tipo A, células interdigitais, células de Langerhans (em tecidos normais), células epitelioides e células gigantes multinucleadas tipo Langerhans ou tipo corpo estranho (em tecidos inflamados) (GOEBELER *et al.*, 1994).

### **CD3:**

É uma proteína de membrana Tipo I encontrada em linfócitos T com peso de 23kDa. Ativação de células T através de receptor antigênico (TCR) envolve a participação de subunidades de CD3: CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon e CD3 zeta. Estas subunidades de CD3 são membros estruturalmente aparentados da superfamília das imunoglobulinas codificados por genes ligados ao cromossomo 11

humano. Os componentes CD3 estão associados com moléculas citoplasmáticas transdutoras de sinais. O antígeno CD3 está presente em 68-82% dos linfócitos periféricos sanguíneos normais, 65-85% dos timócitos e células de Purkinje no cerebelo. Nunca é expresso nas células B ou NK. A região transmembrana da cadeia CD3 está carregada negativamente, uma característica que permite que estas cadeias associem-se com a carga positiva das cadeias do TCR (TCR $\alpha$  e TCR $\beta$ ) (FARAH *et al.*, 2001)

### **3- OBJETIVO**

O objetivo deste trabalho foi testar as seguintes hipóteses: a) se, dentre os inúmeros efeitos terapêuticos da *Arnica montana* 6CH, haveria a possibilidade desta induzir alterações seletivas no recrutamento de linfócitos B e T, neutrófilos e monócitos, com prováveis oscilações na expressão de moléculas de adesão relacionadas ao processo inflamatório agudo; b) se as variações individuais pudessem interferir na eficácia do tratamento, tendo em vista a reabsorção do edema inflamatório e o controle da migração celular.

## 4- MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1- Animais

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos e adultos, pesando entre 250g e 300g, acondicionados em gaiolas de polipropileno convencionais (entre cinco e sete animais por gaiola), em condições de temperatura controlada ( $25\pm3^{\circ}\text{C}$ ), ciclo de luz controlado (período de luminosidade das 6h às 18h) e recebendo água e ração *ad libitum*.

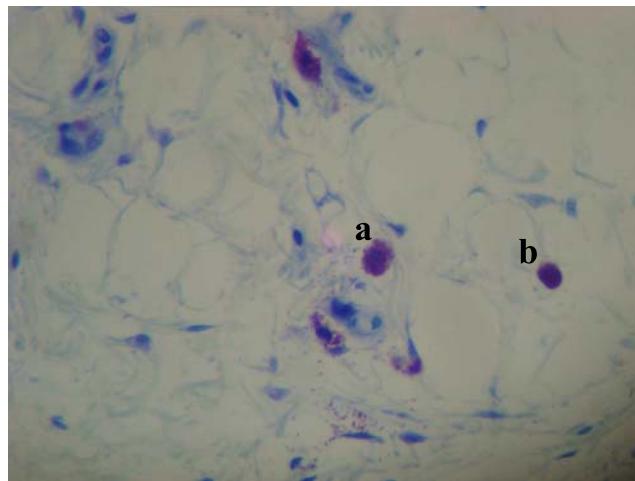
### 4.2- Indução e Avaliação do Processo Inflamatório Agudo por Carragenina

Os animais foram, primeiramente, pesados, identificados e separados em três grupos de 20 indivíduos previamente *randomizados*. O processo inflamatório agudo foi induzido pela administração subcutânea (0,06mL) de suspensão a 1% de carragenina *kappa* (SIGMA) no coxim plantar dos animais, diluída em solução salina estéril. A espessura do coxim foi mensurada previamente com um micrômetro.

Trinta e cento e oitenta minutos após a injeção da carragenina (pico do edema) (LEME *et al.*, 1977) foram realizadas novas medições dos coxins, para avaliação da intensidade do edema em função do tempo. Em seguida, os animais foram sacrificados por aprofundamento

anestésico (éter etílico inalatório) para a retirada do coxim plantar inoculado. Este foi fixado em formol tamponado 10% por no máximo 24 horas e em seguida processado pelos métodos convencionais de inclusão em parafina. As colorações de Hematoxilina-Eosina (HE) e de Azul de Toluidina revelaram a distribuição das células inflamatórias no tecido e a disposição das estruturas linfáticas em um estudo semi-quantitativo.

Para a avaliação da porcentagem de mastócitos degranulados, duzentas células foram contadas por corte sendo diferenciadas as células degranuladas das não degranuladas, a partir de cortes corados com Azul de Toluidina (Figura 1). Para avaliação do diâmetro de vasos linfáticos, cinco campos aleatórios corados pelo mesmo método foram reavaliados quantitativamente num aumento de 200X, utilizando-se o programa Image Tool 3.0. Neste caso, a área média luminal – em pixels – de vasos linfáticos foi calculada por lâmina. O diâmetro vascular linfático reflete a intensidade da reabsorção de edema por essa via, conforme demonstrado por FERRARI, BONAMIN, 2006; BONAMIN, 2008. A hipótese de linfoangiogênese não foi considerada.



**Figura 1. Fotomicrografia de corte histológico de coxim plantar injetado com carragenina 1%. Observar mastócitos sub-cutâneos degranulados (a) e não degranulados (b). Coloração: Azul de Toluidina. Objetiva: 40x.**

#### 4.3- Tratamento

O tratamento dos animais com *Arnica montana* 6CH e solução hidro-alcoólica 5% foi feito em cego e os códigos foram revelados somente após a análise estatística.

As substâncias-teste foram administradas a cada 15 minutos, por via oral, com o auxílio de pipeta automática, entre 30 e 180 minutos após a inoculação de carragenina 1% no coxim plantar. As substâncias testadas foram: para o **controle positivo**, dexametasona (Azium®, dose total 4mg/kg, fracionada em oito administrações, em volume equivalente a 10 µL/100 g PV); para o **controle negativo**, solução hidro-alcoólica a 5% (veículo da *Arnica montana*, em volume

equivalente a 10 µL/100 g PV); para o **grupo experimental**, *Arnica montana* 6CH (10 µL/100 g PV). Este protocolo terapêutico foi desenhado para mimetizar as condições usuais da clínica homeopática em casos agudos e é similar ao utilizado nos estudos anteriores (CARVALHO, BONAMIN, 2001; BONAMIN, 2008).

A preparação homeopática foi feita por farmácia autorizada pela ANVISA, obedecendo aos parâmetros estabelecidos pela Segunda Farmacopéia Homeopática Brasileira, de 1997.

#### **4.4- Tratamento dos dados**

Após o primeiro cálculo de edema formado no período pré-tratamento (espessura do coxim plantar após 30 minutos da inoculação de carragenina menos a espessura inicial), os dados obtidos para cada animal foram classificados em planilha EXCEL 2003 em ordem crescente de valores, de forma a poder separar, dentro de cada grupo, os 10 animais que manifestaram maior intensidade de edema e os 10 animais que manifestaram menor intensidade de edema neste período. Assim, dois sub-grupos de dez animais foram formados para cada grupo experimental.

A plotagem dos dados em um gráfico de linha (Figura 2 A e B) mostrou que os subgrupos que manifestaram edema menos intenso entre 0 e 30 minutos apresentaram o pico do edema mais tarde, ou seja: entre 30 e 180 minutos; caracterizando, assim, duas

subpopulações distintas de ratos quanto ao padrão de manifestação de edema inflamatório (Quadro 1).

**Quadro 1. Esquema representativo dos grupos e sub-grupos experimentais, classificados após tratamento dos dados obtidos em planilha EXCEL 2003.**

| <b>Grupos</b>                                     | <b>Sub-grupos</b>       | <b>Pico de edema</b>      |
|---|-------------------------|---------------------------|
| <b><i>Arnica montana</i><br/>6CH (n=20)</b>       | Edema precoce<br>(n=10) | Até 30 minutos            |
|   | Edema tardio<br>(n=10)  | Entre 30 e 180<br>minutos |
| <b>Dexametasona<br/>(4,0 mg/kg)<br/>(n=20)</b>    | Edema precoce<br>(n=10) | Até 30 minutos            |
|   | Edema tardio<br>(n=10)  | Entre 30 e 180<br>minutos |
| <b>Solução hidro-<br/>alcoólica 5%<br/>(n=20)</b> | Edema precoce<br>(n=10) | Até 30 minutos            |
|   | Edema tardio<br>(n=10)  | Entre 30 e 180<br>minutos |

Todos os resultados foram comparados entre os seis sub-grupos. Esta seleção *a posteriori* foi feita a fim de pôr à prova a questão da necessidade de idiossincrasia vinculada ao princípio de similitude.

#### **4.5- Avaliação imuno-histoquímica**

*4.5.1- Preparação das lâminas:* Todas as lâminas foram lavadas em solução álcool-éter (1:1) durante cinco minutos e depois secas com lenços de papel. Cortes de 5 $\mu$ m foram colocados em banho histológico com água a 40°C antes de serem transferidos para as lâminas pré-tratadas com poli-L-lisina (SIGMA) na diluição de 1:10.

*4.5.2- Desparafinização dos cortes:* As lâminas com cortes em parafina passaram duas vezes em xilol por aproximadamente dois minutos e duas vezes em álcool absoluto por 3 minutos. Em seguida foram colocadas em água corrente.

*4.5.3- Imuno-histoquímica:* Para desmascaramento antigênico as lâminas foram pré-aquecidas por 20 minutos com tampão citrato (5,29g de citrato:1,8L de água destilada) (SIGMA), pH = 6.0, acrescido de Tween 20 (0,9ml) (DAKO). Ao final desta etapa as lâminas foram lavadas em PBS, pH=7.2 (1 pastilha : 200ml de água) (SIGMA), por 6 minutos. Lâminas foram secas com lenços de papel e os cortes foram delimitados com auxílio da caneta Pap Pen (AbCam).

A peroxidase endógena foi bloqueada com incubação por 15 minutos em solução H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% (LABORATÓRIO TAYUYNA LTDA) diluída 1:4 em álcool Metílico PA (ISOFAR). Depois de lavados em PBS (SIGMA) por 6 minutos, os cortes foram incubados com soro de cavalo (IMPRESS) por 20 minutos e posteriormente incubados com anticorpo primário overnight a 4°C em câmara úmida. As diferentes diluições do

anticorpo primário foram feitas em soroalbumina bovina (BSA) 1% (Quadro 2).

No dia seguinte, os cortes foram retirados da câmara úmida e lavados em PBS por 6 minutos, incubados por 30 minutos com IMPRESS UNIVERSAL (VECTOR) – anticorpo secundário conjugado a micropolímeros associados à peroxidase – e novamente lavados em PBS por 6 minutos e incubados com DAB (DAKO) por 3 segundos. Após serem lavados em água corrente, os cortes foram contracorados com Hematoxilina de Harris e montados entre lâmina e lamínula.

**Quadro 2. Marcadores utilizados na imuno-histoquímica:**

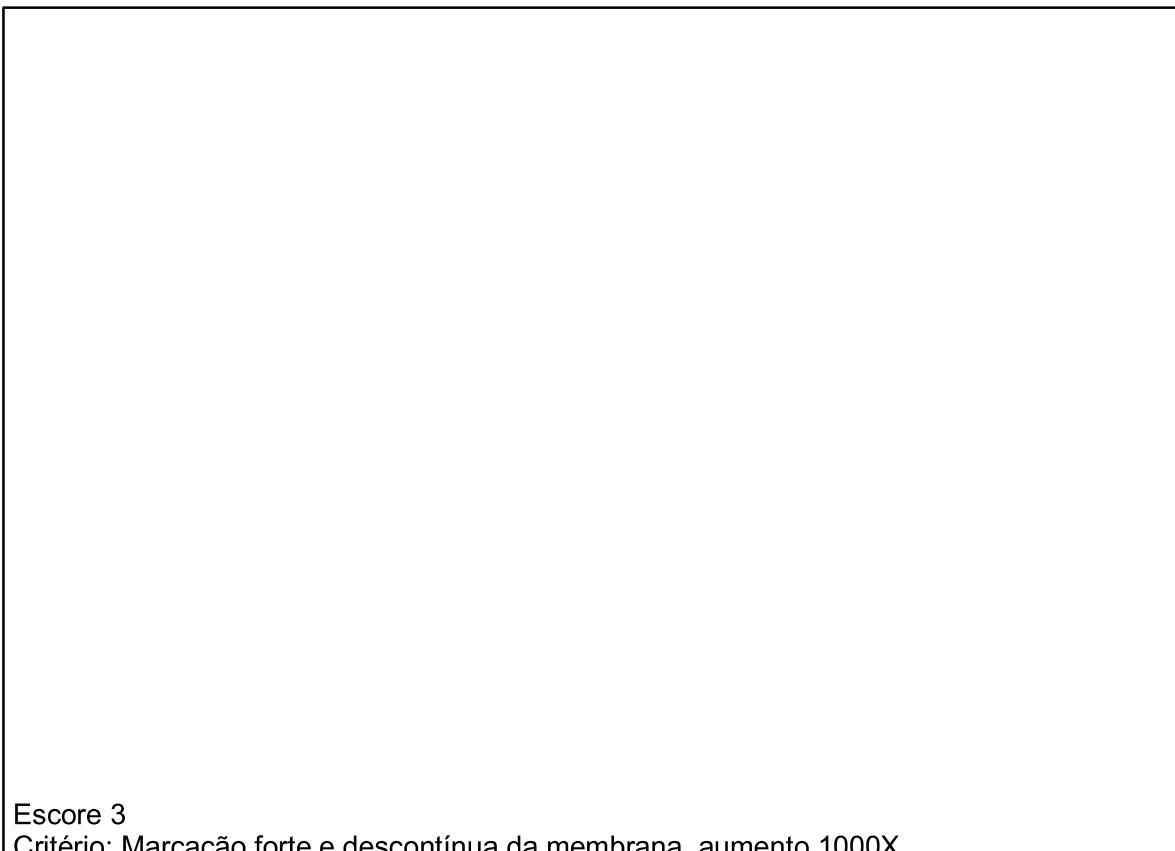
| Marcador            | Célula                               | Fabricante | Alvo Molecular   | Clone                | Espécies (origem/alvo) | Diluição           |
|---------------------|--------------------------------------|------------|--|----------------------|------------------------|--------------------|
| <b>Anti-CD54</b>    | Endotelial ativada                   | Serotec    | Reconhecimento de molécula de adesão (ICAM 1)                  | 1A29                 | Camundongo - rato      | 1:10<br>(5 µg/mL)  |
| <b>Anti-CD45RA</b>  | Linfócito B                          | Serotec    | Reconhecimento de proteína de superfície (LCA)                 | OX-33 (B cells only) | Camundongo - rato      | 1:10<br>(5 µg/mL)  |
| <b>Anti-CD18</b>    | Leucócitos                           | Serotec    | Reconhecimento de molécula de adesão (Integrina β2)            | WT.3                 | Camundongo - rato      | 1:10<br>(5 µg/mL)  |
| <b>Anti-CD163</b>   | Macrófagos ativados                  | Serotec    | Reconhecimento de glicoproteína de superfície (ED2)            | ED2                  | Camundongo - rato      | 1:10<br>(5 µg/mL)  |
| <b>Anti-MAC 387</b> | Monócitos, macrófagos e granulócitos | AbCAM      | Reconhecimento de proteína intracitoplasmática (calprotectina) | policlonal           | Coelho - rato          | 1:20<br>(50 µg/mL) |
| <b>Anti-CD3</b>     | Linfócito T                          | AbCAM      | Reconhecimento de proteína associada ao TCR                    | policlonal           | Coelho - rato          | 1:5<br>(40 µg/mL)  |

**4.5.4- Quantificação:** Para os marcadores CD45RA, CD3, CD18, CD163 e MAC 387 dez campos microscópicos (objetiva de imersão, 100X) foram observados, compreendendo o tecido conjuntivo subcutâneo do coxim plantar, sendo que o número de células marcadas por campo foi registrado. No caso do MAC 387, somente as células mononucleares marcadas foram consideradas na contagem. Para o marcador CD54, a intensidade de marcação na superfície de células endoteliais foi avaliada utilizando escores de 1 a 4. Cinco campos aleatórios foram analisados por corte, sendo a observação realizada por dois observadores independentes. O escore final para cada corte correspondeu à somatória dos escores atribuídos. Os critérios de intensidade de marcação estão representados no Quadro 3.

**Quadro 3. Critérios de intensidade de marcação de células endoteliais para o marcador CD 54**

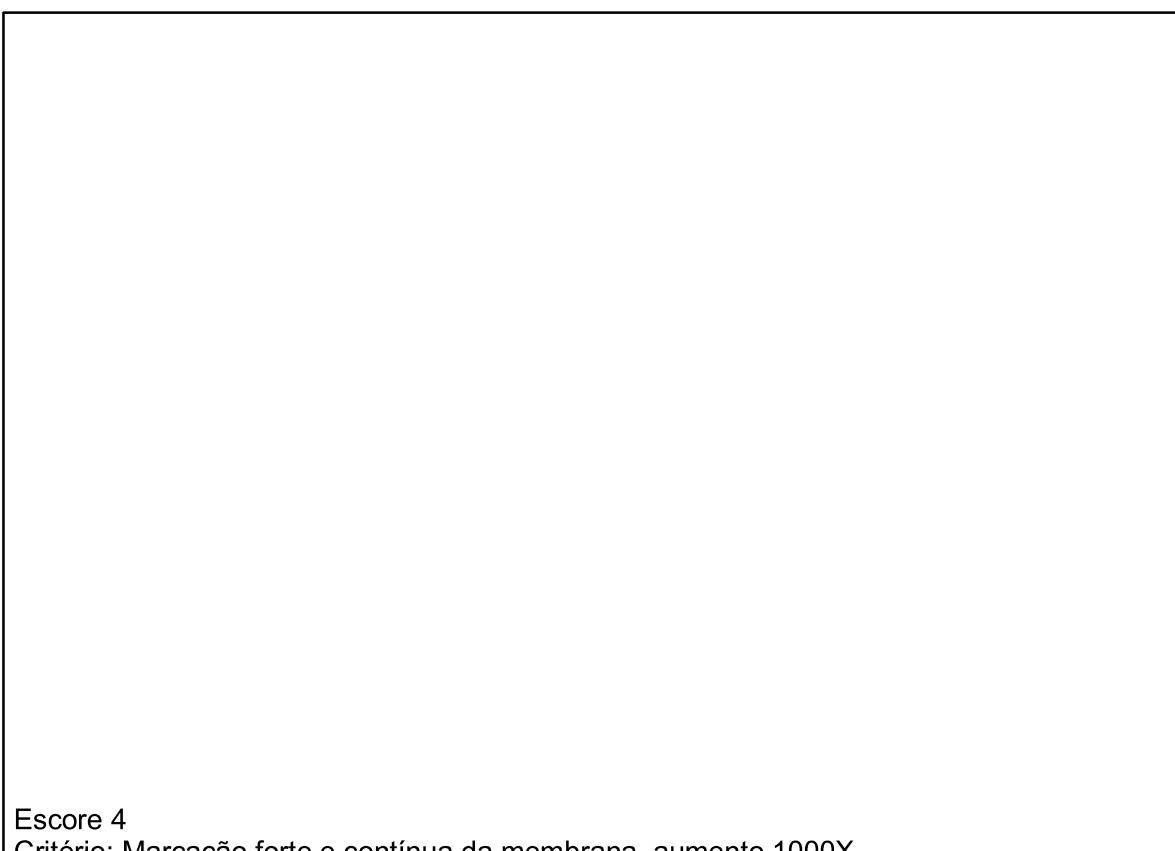
|  |
|--|
|  |
| Escore 1<br>Critério: Marcação fraca e descontínua da membrana, aumento 1000X. |

|  |
|--|
|  |
| Escore 2<br>Critério: Marcação mediana e descontínua da membrana, aumento 1000X. |



Escore 3

Critério: Marcação forte e descontínua da membrana, aumento 1000X.



Escore 4

Critério: Marcação forte e contínua da membrana, aumento 1000X.

#### **4.6- Análise Estatística dos Resultados**

O método empregado foi o Teste de Bartlett para determinação da homocedasticidade das variáveis estudadas, seguindo-se os testes ANOVA/Turkey ou Kruskal-Wallis/Dunn, de acordo com os resultados obtidos previamente pelo exame supracitado. Exceção à avaliação da porcentagem de degranulação de mastócitos, em que se utilizou o método do  $\chi^2$ . O grau de significância estatística foi fixado em  $p\leq 0,05$ .

#### **4.7- Critérios de Bioética**

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de Ética em pesquisa da UNIP, protocolo nº 011/07 CEP/ICS/UNIP, conforme determinado pela lei estadual 11.977/05 que institui o Código de Proteção aos Animais do Estado de São Paulo.

#### **4.8- Conflito de interesses**

Não há conflito de interesses relacionados a este trabalho de pesquisa.

## 5- RESULTADOS

A observação do aspecto histopatológico dos coxins inflamados revelou o quadro clássico das primeiras horas do processo inflamatório, ou seja: edema evidente e infiltrado celular correspondente a 2/3 de células polimorfonucleares (PMN) e 1/3 de células mononucleares (anexo 2).

Após análise geral da evolução do processo inflamatório constatamos a existência de diferentes padrões de respostas entre os animais estudados, o que gerou a necessidade de sistematizar e classificar tais padrões. Assim, para cada grupo experimental – controle, *Arnica montana* 6CH e dexametasona – dois subgrupos foram formados, sendo o primeiro constituído por animais que apresentaram pico precoce de formação de edema, ou seja: nos primeiros 30 minutos de tratamento – batizado de *subgrupo 30 minutos* - e o segundo correspondente aos animais que apresentavam pico tardio de formação de edema, ou seja: dos 30 aos 180 minutos – batizado de *subgrupo 180 minutos*. A Figura 2 mostra a evolução do edema em função do tempo e a intensidade do edema aos 180 minutos, nos seis subgrupos observados.

Observa-se, então, que o efeito anti-edematoso da *Arnica montana* 6CH só pôde ser visto no subgrupo 180 minutos.

A análise histométrica dos cortes corados pelo método de Azul de Toluidina revelou que, também neste caso, o tratamento com *Arnica*

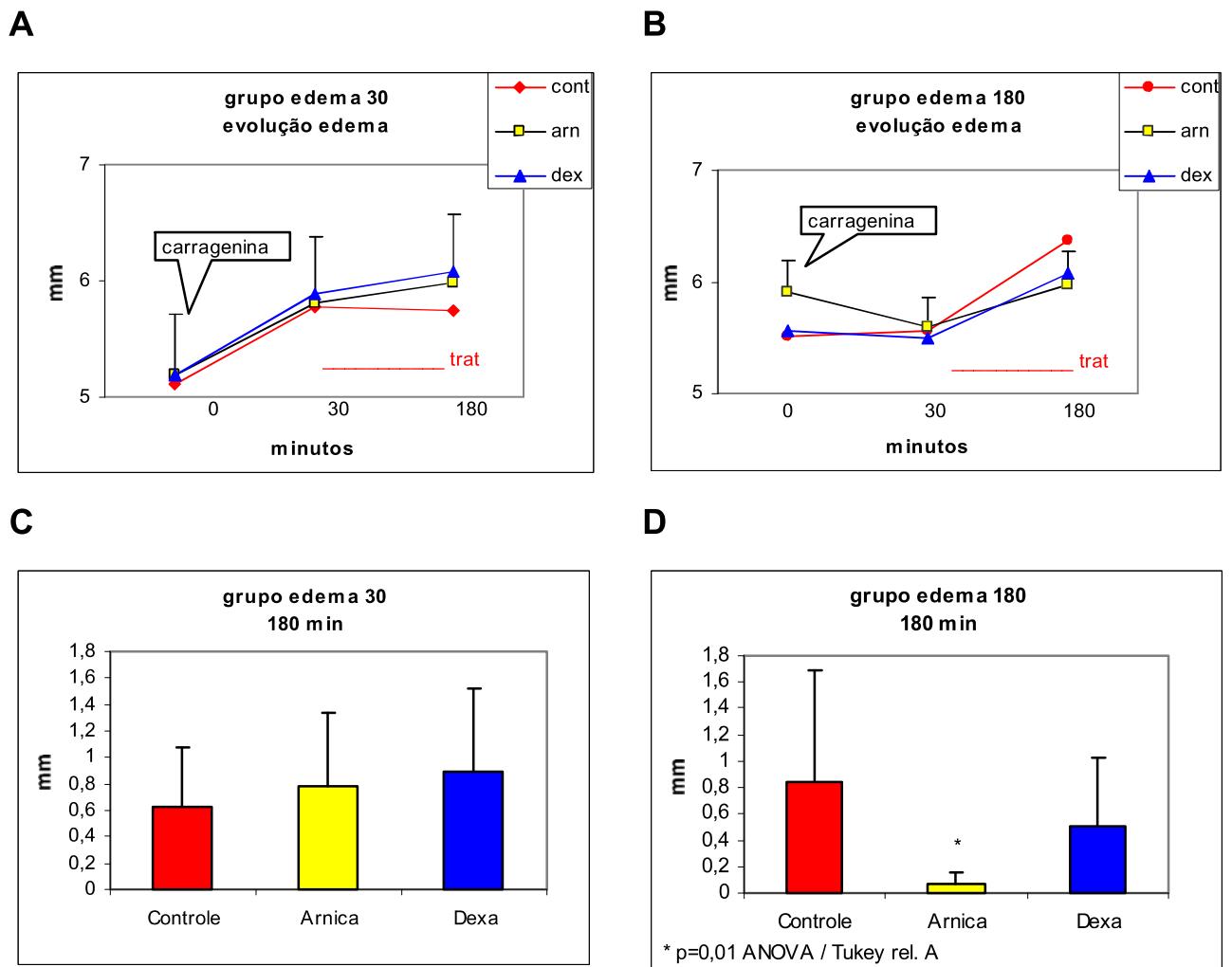
*montana* 6CH induziu menor degranulação de mastócitos nos animais do subgrupo 180 minutos (Figura 3), bem como maior calibre médio de vasos linfáticos (Figura 4).

Nenhum efeito foi observado em relação ao edema e ao calibre de linfáticos nos animais tratados com *Arnica montana* 6CH do subgrupo 30 minutos, contudo, observou-se discreto mas significativo aumento de mastócitos degranulados neste sub-grupo (Figura 3).

A análise histométrica dos cortes corados pelo método de hematoxilina – eosina revelou não haver diferenças significativas entre os diferentes tratamentos, em ambos os subgrupos, em relação ao número de células polimorfonucleares por campo (Figura 5).

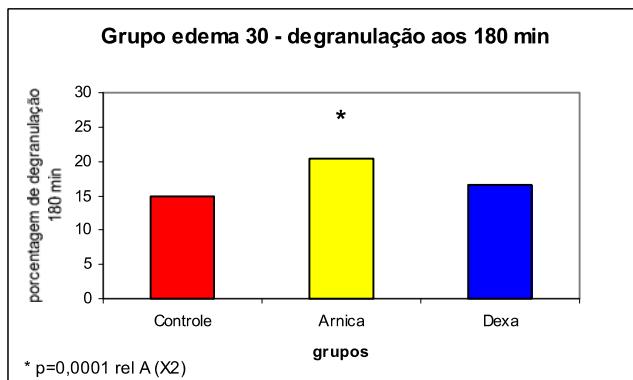
A análise histométrica dos cortes processados para imuno-histoquímica não revelou diferenças significativas entre grupos e subgrupos referentes à contagem de células marcadas por campo, tendo em vista a marcação por imuno-histoquímica para células MAC 387+ (monócitos e macrófagos), células CD163+ (macrófagos ativados), CD3+ (linfócitos T), CD45RA+ (linfócitos B) e CD18+ (leucócitos que expressam integrina beta 2) (Figuras 6, 7, 8).

Além disso, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos e subgrupos quando se calculou a razão entre o total de células marcadas pelo CD163+ (macrófagos ativados) e o total de células marcadas pelo MAC 387+ (monócitos e macrófagos).

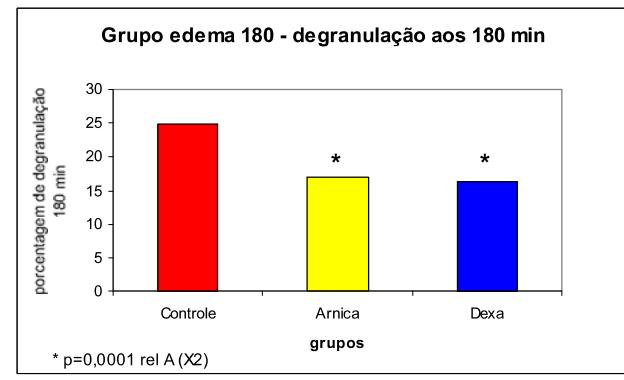


**Figura 2.** Edema medido por micrometria (mm) nos diferentes grupos e sub-grupos experimentais. A) evolução do edema em função do tempo no sub-grupo 30 minutos – edema precoce; B) evolução do edema em função do tempo no sub-grupo 180 minutos – edema tardio; C) intensidade do edema após 3 horas de injeção de carragenina no sub-grupo 30 minutos; D) intensidade do edema após 3 horas da injeção de carragenina no sub-grupo 180 minutos. \* p=0,01; ANOVA, Tuckey-Krammer, em relação ao controle. Os valores representam média ± desvio padrão.

A

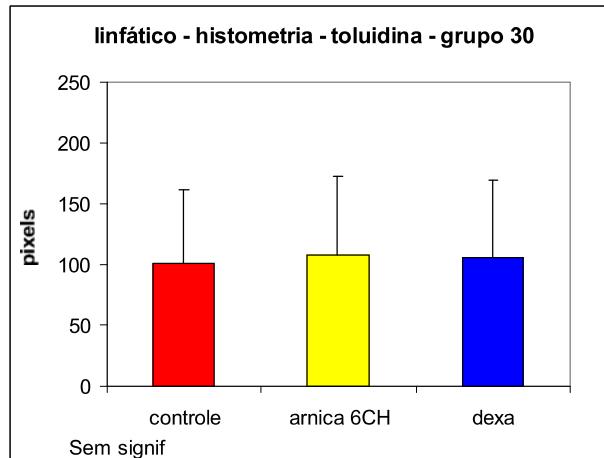


B

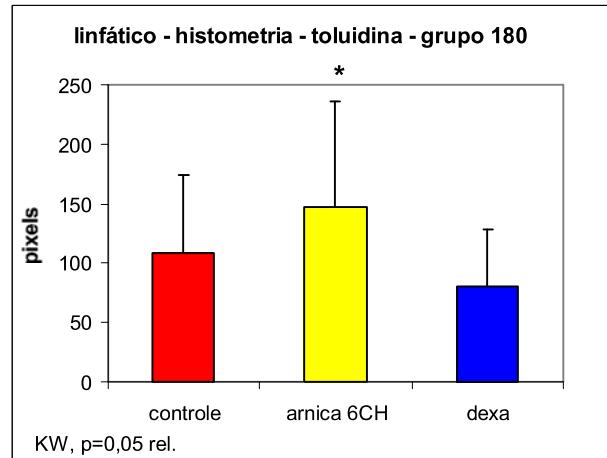


**Figura 3. Porcentagem de mastócitos degranulados nos diferentes grupos e sub-grupos experimentais. A) porcentagem de mastócitos degranulados no sub-grupo 30 minutos – edema precoce; B) porcentagem de mastócitos degranulados no sub-grupo 180 minutos – edema tardio. \*p=0,0001;  $\chi^2$ , em relação ao controle.**

A

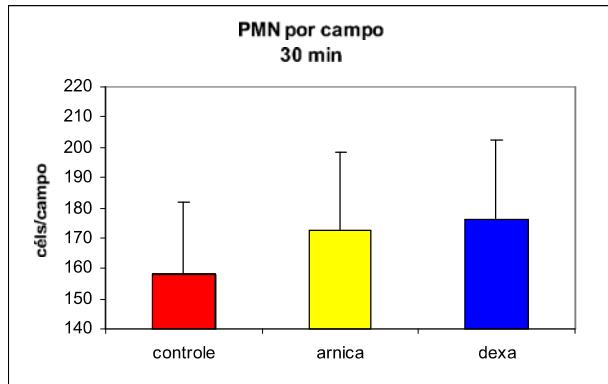


B

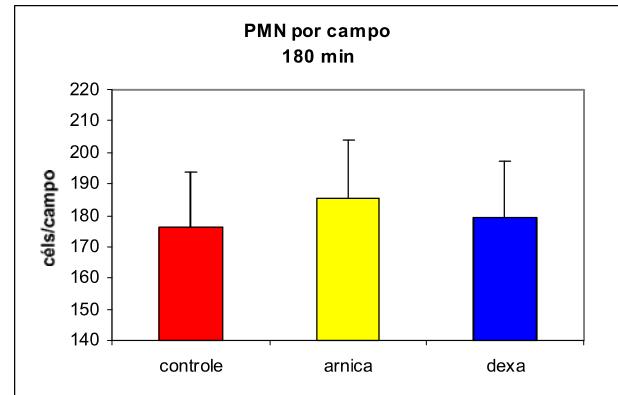


**Figura 4. Diâmetro médio de vasos linfáticos por corte, calculado em pixels, a partir do sistema de análise de imagem Image Tool 3.0. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão. A) diâmetro médio dos vasos linfáticos no sub-grupo 30 minutos – edema precoce; B) diâmetro médio dos vasos linfáticos no sub-grupo 180 minutos – edema tardio. \*p=0,05; Kruskal-Wallis, em relação ao controle. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão.**

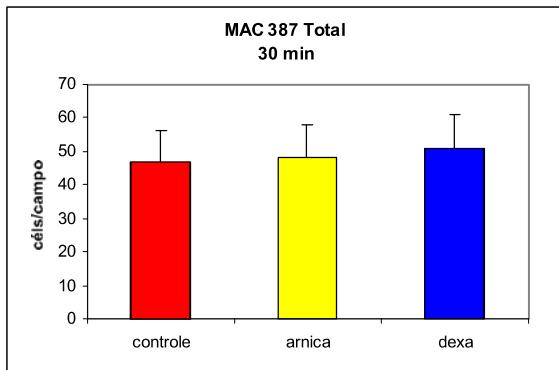
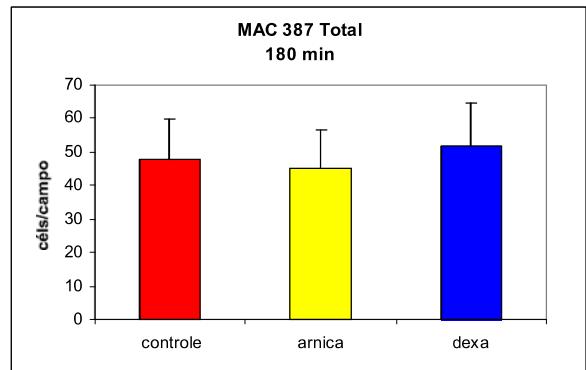
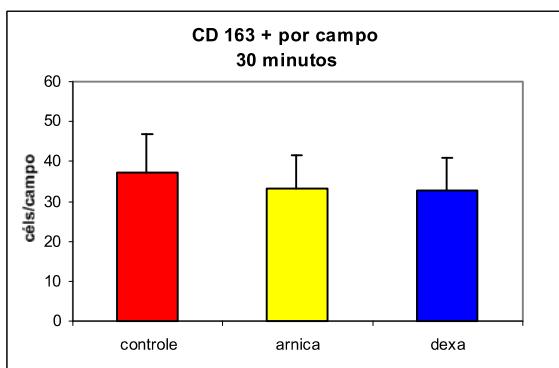
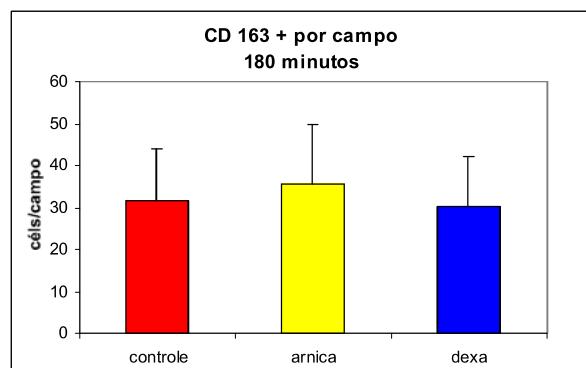
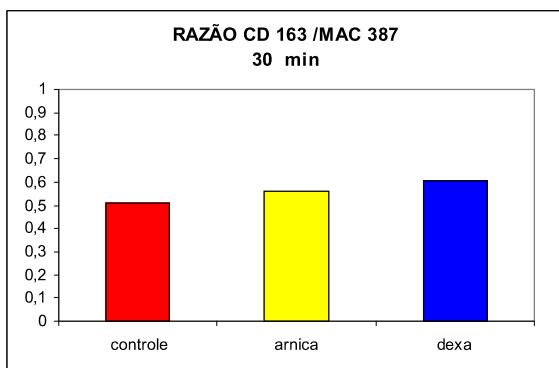
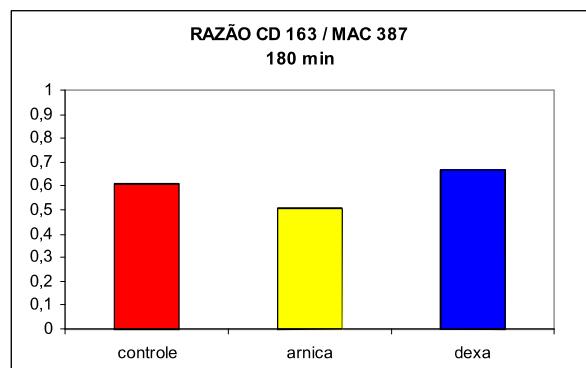
A



B

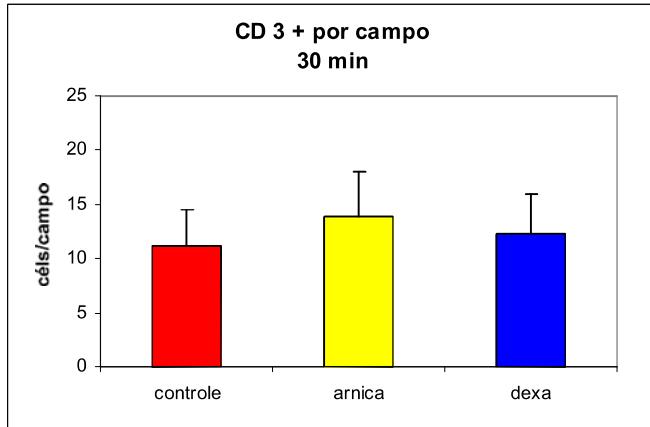


**Figura 5.** Total de células PMN por campo nos diferentes grupos experimentais. A) número de células PMN no sub-grupo 30 minutos – edema precoce; B) número de células PMN no sub-grupo 180 minutos – edema tardio. Os valores representam média ± desvio padrão.

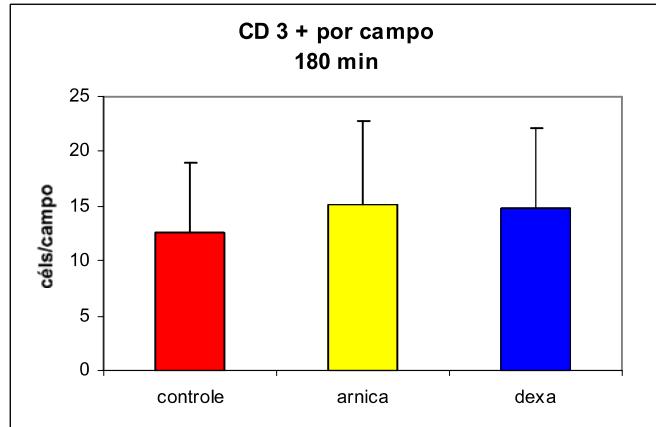
**A****B****C****D****E****F**

**Figura 6.** Total de células marcadas por campo pelo MAC387 e CD163 nos diferentes grupos experimentais. A) número total de células marcadas por campo pelo MAC 387 no sub-grupo 30 minutos – edema precoce; B) número total de células marcadas por campo pelo MAC 387 no sub-grupo 180 minutos – edema tardio; C) número de células por campo marcadas pelo CD163 no sub-grupo 30 minutos; D) número de células por campo marcadas pelo CD163 no sub-grupo 180 minutos; E) razão entre CD163/MAC 387 no sub-grupo 30 minutos; F) razão entre CD163/MAC 387 no sub-grupo 180 minutos. Os valores representam média ± desvio padrão.

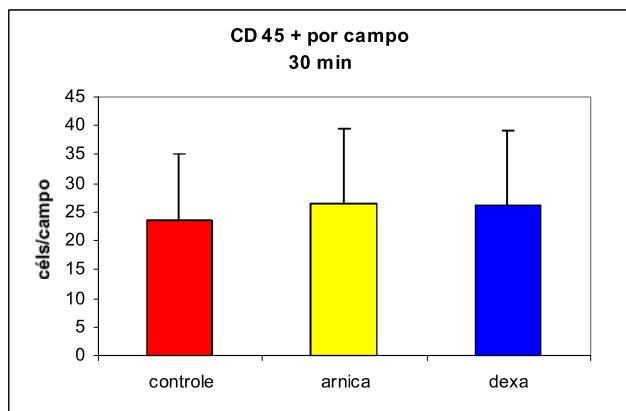
A



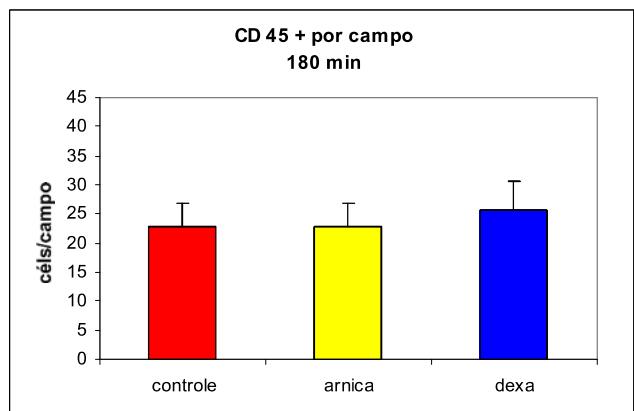
B



C

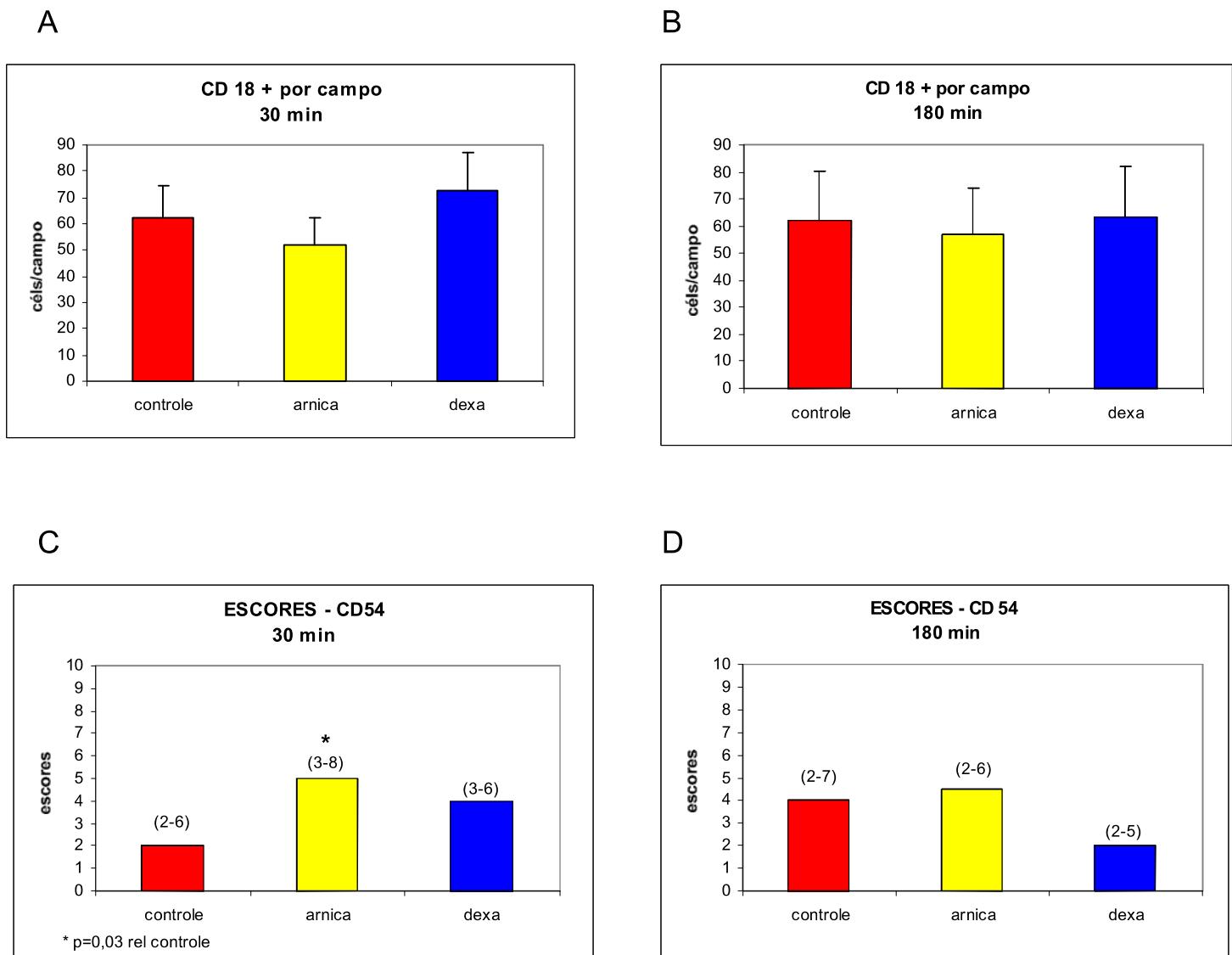


D



**Figura 7.** Total de células marcadas pelo CD3 e pelo CD45 nos diferentes grupos experimentais. A) número de células marcadas por campo pelo CD3 no sub-grupo 30 minutos; B) número de células marcadas por campo pelo CD3 no sub-grupo 180 minutos; C) número de células marcadas por campo pelo CD45 no sub-grupo 30 minutos; D) número de células marcadas por campo pelo CD45 no sub-grupo 180 minutos. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão.

A classificação de células endoteliais CD 54 + (ICAM 1) por escores também não revelou diferenças significativas entre os diferentes tratamentos no subgrupo 180 minutos, mas apresentou aumento na mediana dos escores nos animais do subgrupo 30 minutos tratados com *Arnica montana* 6CH (Figura 8).



**Figura 8.** Total células marcadas pelo CD18 e pelo CD54 nos diferentes grupos experimentais. A) número de células marcadas por campo pelo CD18 no sub-grupo 30 minutos; B) número de células marcadas por campo pelo CD18 no sub-grupo 180 minutos; C) número de células marcadas por campo pelo CD54 no sub-grupo 30 minutos; D) número de células marcadas por campo pelo CD54 no sub-grupo 180 minutos. Os valores representam mediana e intervalo.

## 6- DISCUSSÃO

Dentre os medicamentos homeopáticos estudados experimentalmente em modelos de inflamação (PEDALINO *ET AL.*, 2004; ARAÚJO-PRADO NETO *et al.*, 2004; BELLAVITE *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2007), a arnica tem despertado interesse por um grande número de pesquisadores (KAROW *et al.*, 2007). Contudo, observa-se na novíssima literatura científica homeopática um grande volume de trabalhos descritivos, em que se busca demonstrar a eficácia de seus efeitos, mas poucos trabalhos são focados para a compreensão das mudanças na fisiopatologia decorrentes da interferência de tais medicamentos (BELLAVITE *et al.*, 2006).

É deste ponto que parte o presente trabalho. Através de um estudo minucioso do comportamento do tecido conjuntivo vascularizado inflamado e dos subtipos celulares envolvidos, buscou-se conhecer as variações fisiopatológicas que pudessem decorrer da ação da *Arnica montana* 6CH na modulação do processo inflamatório agudo.

Os primeiros resultados obtidos neste estudo já apontaram para um fato: animais diferentes expressam padrões diferentes de resposta frente ao tratamento com *Arnica montana* 6CH. Assim, a análise individual de cada subgrupo chama a atenção para questões referentes à temporalidade e mecanismos de atuação da *Arnica montana* 6CH. Nota-se que para uma atuação mais eficaz deste medicamento foi necessário que o pico de formação de edema

acontecesse concomitantemente à administração do mesmo, conforme constatado no subgrupo 180 minutos. Esses animais, quando tratados, além de apresentarem o pico de edema significativamente menor que os grupos controle e dexametasona, também apresentaram diminuição significativa na porcentagem de mastócitos degranulados e aumento do calibre de vasos linfáticos, o que provavelmente contribuiu para uma menor formação de edema.

Esses resultados vão de encontro com dados obtidos anteriormente, em que a redução do edema por aumento de absorção linfática em ratos tratados com *Arnica montana* 6CH foi demonstrada em processo inflamatório agudo do coxim plantar inoculado com carragenina (BONAMIN, 2008). Futuramente, estudos mais detalhados sobre a ação da arnica sobre a dinâmica vascular linfática poderão ser feitos, com base em identificação por imuno-histoquímica de marcadores específicos, como a podoplanina (D2-40), seguida de histometria.

Sabe-se que o controle do calibre dos vasos linfáticos está diretamente ligado ao grau de distensão da matriz extra-celular durante a formação do edema (BONAMIN, 2008). Em estudos futuros, uma análise minuciosa da estrutura molecular da matriz poderia relevar os possíveis mecanismos envolvidos.

A observação do efeito anti-edematoso da *Arnica montana* 6CH exclusivamente nos animais que manifestaram padrão tardio de inflamação aguda sugere fortemente a provável influência da mesma sobre vias de modulação ligadas à ação de mediadores inflamatórios

com ação menos precoce, como a histamina e as prostaglandinas – as quais têm seu pico de atuação em torno de 15 a 20 minutos após a deflagração do processo inflamatório agudo – e não sobre vias de modulação ligadas a mediadores de ação muito precoce, tal como a bradicinina – a qual induz o pico de edema entre 5 a 10 minutos (LEME *et al.*, 1976). Essa observação corrobora os achados de Carvalho e Bonamin (2001).

Modelos experimentais desenhados a fim de se demonstrar a importância das variações individuais na evidenciação dos efeitos de produtos homeopáticos já foram descritos anteriormente. Cristea *et al.* (1997b) demonstraram que a seleção de ratos hiperativos possibilitou demonstrar os efeitos da Chamomilla (30CH) na atividade geral observada em campo aberto. O mesmo desenho experimental foi utilizado por Rocha *et al.* (2008) e Soares (2007), sendo que nestes casos também a idiossincrasia entre medicamento e animal determinou a observação de efeitos significativos dos medicamentos utilizados. Em Rocha *et al.* (2008), somente ratos naturalmente hiperativos foram responsivos ao *Rhus toxicodendron* 200CH; em contrapartida, em Soares (2007), somente ratos naturalmente hipoativos responderam ao tratamento com *Bryonia alba* 200CH.

Outra importante contribuição do presente trabalho está na análise do processo de migração celular para o sítio da inflamação aguda através dos métodos de imuno-histoquímica e histometria.

A escolha dos marcadores teve como critério os seguintes aspectos: a identificação de células mononucleares em função de diferentes origens e de graus de maturação; a identificação de moléculas de adesão e a disponibilidade de anticorpos primários anti-rato disponíveis no mercado.

Macrófagos fazem parte do sistema mononuclear fagocitário. Os macrófagos imaturos encontrados no sangue são denominados monócitos. Embora monócitos e macrófagos em repouso sejam fagócitos efetivos, eles podem ser facilmente ativados de forma que suas funções sejam significativamente potencializadas. Reconhecem-se os diferentes níveis de ativação. Baseado nisso, utilizou-se os marcadores CD163 – expresso exclusivamente em histiócitos ativados (FABRIEK *et al.*, 2005; FABRIEK *et al.*, 2008) – e MAC 387 – expresso em monócitos e macrófagos teciduais, além de granulócitos (GOEBELER *et al.*, 1994). A observação da proporção entre histiócitos ativos (CD163+) e totais (MAC387+) indicou o grau de ativação do conjunto dessas células no sítio inflamatório, conforme demonstrado na Figura 6.

Os linfócitos, embora raros nos processos inflamatórios agudos, podem exercer papel modulador sutil em alguns casos, conforme descrito em artigos clássicos sobre o assunto (BECHARA *et al.*, 1976; LEME *et al.*, 1976; LEME *et al.*, 1977). Assim, os marcadores CD3 (linfócitos T) e CD45RA (linfócitos B) foram utilizados para a identificação destas células.

Para as moléculas de adesão, os marcadores CD18 (integrina  $\beta 2$ ) e CD54 (ICAM 1) foram escolhidos por representarem importantes moléculas de adesão atuantes na inflamação aguda e também pela disponibilidade de anticorpos específicos no mercado compatíveis com as condições experimentais presentes.

Achados anteriores obtidos através do modelo da pleurisia induzida por carragenina (BONAMIN, 2008) mostram a extensão no tempo de migração de células polimorfonucleares de uma para quatro horas, em ratos tratados com *Arnica montana* 6CH. De fato, neste modelo de pleurisia há predomínio de atividade de PMN até 4 horas, seguido da migração de mononucleares entre 4 e 48 horas (PARENTE *et al.*, 1979). No presente trabalho, nenhuma modificação foi encontrada em relação ao número de células inflamatórias por campo, independente do marcador utilizado. Essa observação aponta para outra particularidade da *Arnica montana* 6CH: a dependência do contexto experimental para a seleção de diferentes caminhos de modulação do processo inflamatório. Enquanto que no modelo de pleurisia descrito por Bonamin (2008) houve alteração no padrão de migração celular, nenhuma alteração na degranulação de mastócitos pleurais foi vista. Já no presente modelo – inflamação do tecido conjuntivo subcutâneo – observou-se padrão diverso: não houve alteração numérica considerando monócitos, polimorfonucleares e linfócitos (T e B) envolvidos no processo, mas houve evidente modificação na reabsorção do edema e na degranulação de mastócitos.

Estudos futuros podem esclarecer os possíveis mecanismos de atuação da *Arnica montana* 6CH sobre a organização dos diferentes mediadores em diferentes sítios de evolução do processo inflamatório. Observa-se que a participação da enzima NO sintetase poderia ser a chave para uma hipótese que explicaria os diferentes padrões encontrados entre pleurisia e inflamação no tecido subcutâneo, uma vez que interações entre cicloxigenase e NO representam importante mecanismo para modulação da resposta inflamatória pleural (SAUTEBIN *et al.*, 1998).

A inibição da ativação do fator nuclear kappa-beta bloqueia a formação de exsudato e infiltrado leucocitário na pleura, pois induz a expressão da NO sintetase (D'ACQUISTO *et al.*, 1999). Ialenti *et al.* (2000) demonstraram que a administração de baixas doses de aminoguanidina – inibidor da NO sintetase – aumenta o infiltrado inflamatório, o mesmo não acontece quando altas doses são administradas.

Sabendo-se que a *Arnica montana* apresenta como principal princípio ativo a helenalina e esta bloqueia o fator nuclear kappa-beta (KLASS *et al.*, 2002), a seguinte hipótese poderia ser formulada: concentrações diminutas de helenalina poderiam ter um papel relevante na modulação da síntese e atuação do NO na pleurisia e na modulação da migração celular, mas o mesmo não seria válido no tecido subcutâneo, dada a menor dependência de NO na modulação da migração leucocitária neste sítio. De certo, novas pesquisas seriam necessárias para tais demonstrações.

Oscilações nos padrões de resposta também são vistas comparando-se os subgrupos 30 e 180 minutos. No primeiro caso, não se observou nenhuma evidência de modulação dos eventos vasculares da inflamação induzida, mas observou-se aumento na porcentagem de mastócitos degranulados por campo e aumento nos escores de expressão de CD54 (ICAM 1). A interpretação deste achado é extremamente difícil, dada a ausência de representatividade biológica, uma vez que não se observou alterações na migração celular em paralelo. Sugere-se que seja um “efeito residual pós-pico inflamatório”, mas estudos futuros que versem sobre a cinética do processo nesses casos são ainda necessários. De fato, Tasman *et al.* (1999) mostraram, por imuno-histoquímica, que a expressão de CD54 em polpa dentária - inflamada ou não - pode ser bastante variável.

A explicação para essas variações ainda não é conhecida, mas observa-se no universo da pesquisa básica em homeopatia que a oscilação de ações e mecanismos em função do contexto tem sido um achado freqüente ao longo dos anos (BASTIDE *et al.*, 1987; DAURAT *et al.*, 1988; SANTOS *et al.*, 2007; MARTINHO *et al.*, 2008).

Essa constatação evidencia outro aspecto crítico da pesquisa homeopática: não apenas as altas diluições e o princípio de similitude constituem uma dificuldade intrínseca para a aplicação da metodologia científica tradicional, como também é preciso estabelecer novas bases racionais para a interpretação de resultados, em que as referências passam a ser os padrões de organização dos sistemas e não apenas

a presença ou a afinidade de receptores específicos para moléculas específicas (BONAMIN, 2005; BONAMIN *et al.*, 2008).

Felizmente, novas áreas do conhecimento têm oferecido ferramentas racionais para esse tipo de abordagem, como a *biologia do conhecimento* (MATURANA, 1997), a biossemiótica (BARBIERI, 2007) e a teoria dos significados corporais (BASTIDE; LAGACHE, 1997; BONAMIN *et al.*, 2008), o que é bastante promissor para a concepção de modelos experimentais em estudos futuros.

## 7- CONCLUSÃO

A *Arnica montana* 6CH não altera o padrão de migração celular no processo inflamatório agudo subcutâneo, mas modula outros parâmetros inflamatórios, como a reabsorção do edema, o calibre de vasos linfáticos, a degranulação de mastócitos e a expressão de moléculas de adesão (CD 54), em função das características individuais selecionadas pelo padrão de formação de edema nos animais testados.

## 8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA LR.; CAMPOS COM.; HERRERA HM.; BONAMIN LV.; FONSECA AH. Effects of homeopathy in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Homeopathy**, v.97, p.65-69, 2008.

ALBERTINI, H.; GOLDBERG, W. Bilan de 60 observations randomisées d'Arnica, Hypericum contre Placebo dans les névralgies dentaires. In: POITEVIN, B. (Ed.). **Le devenir de l'Homeopathie – Elements de theorie et recherche**. Paris: Doin Editeurs, p.107-130, 1984.

ARAÚJO PRADO NETO J, PERAZZO FF, CARDOSO LGV, BONAMIN LV, TAVARES CARVALHO JC. Action of *Causticum* in inflammatory models. **Homeopathy**, v.93, p.12-16, 2004.

BARBIERI M (Ed). Introduction to biosemiotics – The new biological synthesis. Dordrecht: Springer; 2007. ISBN-10 1-4020-4813-0 (HB).

BARCLAY, A.N.; JACKSON, D.I.; WILLIS, A.C.; WILLIAMS, A.F. Lymphocyte specific heterogeneity in the rat leucocyte common antigen (T200) is due to differences in polypeptide sequences near the NH<sub>2</sub>-terminus. **The EMBO journal**, v.6, p.1259-1264, 1987.

BASTIDE M.; DAURAT V.; DOUCET-JABCEUF M.; PELEGREN A.; DORFMAN P. Immunomodulator activity of very low doses of thymulin in mice. **International Journal of Immunotherapy**, v.3, p.191-200, 1987.

BASTIDE M.; LAGACHE A. Communication process: a new paradigm applied to high-dilution effects on the living body. **Althernative Theraphy Health Medicine**, v.3, p.35-39, 1997.

BECHARA GH.; SUDO L.; RIBEIRO DOS SANTOS R.; LEME JG. Modulation by lymphocytes of the vascular effects caused by inflammatory mediators and carrageenin in the rat. **British Journal of Experimental Pathology**, v.57, p.497-504, 1976.

BELLAVITE P.; CONFORTI A.; PONTAROLLO F.; ORTOLANI R. Immunology and Homeopathy. 2. Cells of the Immune System and Inflammation. **eCAM**, v.3, p.13-24, 2005.

BELON P.; CUMPS J.; ENNIS M.; MANNAIONI PF.; ROBERFROID M.; SAINTE-LAUDY J.; WIEGANT FAC. Histamine dilutions modulate basophil activation. **Inflammation Research**, v.53, p.181-188, 2004.

BENEZ, S.M.; **Manual de Homeopatia Veterinária**. In: TECMEDD (Ed.), p.57-58, 2004.

BENITES NR. Homeopatia. In: SPINOSA HS. (Ed.). **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**, v.3, p.700-108, 2002.

BERCHIERI A, TURCO WCP, PAIVA JB, OLIVEIRA GH, STERZO EV. Evaluation of isopathic treatment of *Salmonella enteritidis* in poultry. **Homeopathy**, v.95, p.94-97, 2006.

BETTI L; LAZZARATO L; TREBBI G; BRIZZI M; CALZONI GL; BORGHINI F; NANI D. Effects of homeopathic arsenic on tobacco plant resistance to tobacco mosaic virus. Theoretical suggestions about system variability, based on a large experimental data set. **Homeopathy**, v. 92, p. 195-102, 2003.

BITTENCOURT LC; DIEGUEZ AD; CARVALHO AC. Efeitos da administração de *Arnica montana* (tintura-mãe e preparações UHD) nas alterações estruturais vasculares durante o processo inflamatório agudo. **VII SINAPIH**, 2002, Rio de Janeiro. Resumos. Rio de Janeiro: SINAPIH, 2002 (meio de divulgação magnético).

BONAMIN LV.; LAGE-MARQUES M.; CARVALHO AC. Efeitos da *Arnica montana* (tintura mãe e ultradiluições) no processo inflamatório agudo. In: **XV Reunião Anual da Fesbe**, 2000, Caxambu. Resumos. São Paulo: FESBE, 2000. ref.18.035.

BONAMIN LV.; MARTINHO KS.; NINA AL.; CAVIGLIA F.; DO RIO RGW. Very high dilutions of dexamethasone inhibit their pharmacological effects *in vivo*. **British Homeopathic Journal**, v.90, p.198-203, 2001.

BONAMIN LV. Experimental Illustrations of body signifiers theory. In: Halm, R. **Unconventional medicine in front of science – a new approach to health – body intelligence.** Monte Carlo, Les Entretiens Internationaux de Monaco Editions. p.195-207. 2005. ISBN. 2-915664-01-9.

BONAMIN LV. *Arnica montana* and behavior of connective tissue: 10 years of study. In: **XXI Symposium of GIRI**, 2007, Monte Carlo. Abstracts. Monte Carlo. GIRI, 2007. [www.giriweb.com](http://www.giriweb.com)

BONAMIN LV. *Arnica montana* and behavior of connective tissue. In: **Bonamin LV (Ed).** Signals and Images: Contributions and contradictions of high dilution research. Dordrecht, Springer, p. 113-125, 2008.

BONAMIN LV.; LAGACHE A.; BASTIDE M. Research on ultra-dilutions and the Theory of Corporeal Signifiers: the follow up. In: **Bonamin LV (Ed).** Signals and Images: Contributions and contradictions of high dilution research. Dordrecht, Springer, p.9-43, 2008.

BONFIM, F.P.G.; MARTINS, E.R.; DORES, R.G.R.; BARBOSA, C.K.R.; CASALI, V.W.D.; HONÓRIO, I.C.G. Use of homeopathic *Arnica montana* for the issuance of roots of *Rosmarinus officinalis* L. and *Lippia alba* (Mill) N.E.Br. **International Journal of High Dilution Research**, v.7, p.72-76, 2008.

BROOKS, K.J.; COLEMAN, E.J.; VITETTA, E.S. The antitumor activity of an anti-CD54 antibody in SCID mice xenografted with human breast, prostate, non-small cell lung, and pancreatic tumor cell lines. **International Journal of Cancer**, v.123, p.2438-2435, 2008.

BUCAY JW. Algunas notas sobre la planta medicinal *Árnica montana*. **Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social**, v.33, p.306-26, 1995.

CAMPBELL A. Two pilot controlled trials of *Arnica montana*. **British Homeopathic Journal**, v.3, p.154-158, 1976.

CARVALHO AC. **Efeitos da administração de *Arnica montana* (tintura-mãe e UHD) na atividade de diferentes agentes flogísticos em ratos.** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Paulista – UNIP, 52f, 2000.

CARVALHO AC.; BONAMIN LV. Efeitos da *Arnica montana* (tintura-mãe e preparações dinamizadas 6CH) na atividade de diferentes agentes flogísticos em ratos. **Pesquisa Homeopática**, v.16, p. 31-43, 2001.

CHAKRABARTI A. Treatment of hematoma in dog: A non surgical approach. **Indian Veterinary Journal**, v.71, p.1229-30, 1991.

COELHO CP, D'ALMEIDA V, PEDRAZZOLLI NETO M, DURAN-FILHO C, FLORIO JC, ZINCAGLIA LMC, BONAMIN LV. Therapeutic and Pathogenetic animal models for *Dolichos pruriens*. **Homeopathy**, v.95, p.136-143, 2006.

CORRÊA, A.D.; SIQUEIRA-BATISTA, R.; QUINTAS, L.E.M. Similia Similibus Curentur: notação histórica da medicina homeopática. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, p.347-351, 1997.

CRISTEA A; NICULA S; DARIE V. Pharmacodynamic effects of very high dilutions of Belladonna on the isolated rat duodenum. In: Bastide, M. (Ed.). **Signals and Images**. Dordrecht, Kluwer Academic Publisher, p.161-170, 1997(a).

CRISTEA A; TEODORESCU-NEGRES S; DARIE V. Chamomilla Homeopathic Dilution Effect on Central Nervous System. In: Bastide, M. (Ed.). **Signals and Images**. Dordrecht, Kluwer Acad. Publishers, p.171-178, 1997(b).

D'ACQUISTO F; IALENTI A; IANARO A; CARNUCCIO R. Nuclear factor-kappaB activation mediates inducible nitric oxide synthase expression in carrageenin-induced rat pleurisy. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, v.360, p.670-675, 1999.

DAURAT V.; DORFMAN P.; BASTIDE M. Immunomodulatory activity of low doses of interferon  $\alpha,\beta$  in mice. **Biomed. & Pharmacother**, v.42, p.197-206, 1988.

DAVENAS E.; POITEVIN B.; BENVENISTE J. Effect on mouse peritoneal macrophages of orally administered very high dilutions of *Silicea*. **European Journal of Pharmacology**, v.135, p.313-319, 1987.

DEL GIUDICE E. Is the memory of water a physical impossibility? In: ENDLER, P. C.; SCHULTE, J. (Eds). **Ultra High Dilution – Physiology and Physics**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p.117-120, 1994.

DEL GIUDICE E.; PREPARATA G. Coherent electrodynamics in water. In: ENDLER, P. C.; SCHULTE, J. (Eds). **Fundamental Research in Ultra Hugh Dilution and Homeopathy**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p.89-104, 1998.

ENDLER PC.; SCHULTE J. Preliminary elements of a theory on ultra high dilutions. In: ENDLER, PC.; SCHULTE J. (Eds). **Ultra high dilution: Physiology and Physics**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p.245-251, 1994.

ENDLER PC.; PONGRATZ W.; SMITH CW.; SCHULTE J. Non-molecular information transfer from thyroxine to frogs with regards to 'homeopathic' toxicology. **Jounal of Veterinary and Human Toxicology**, v.37, p.259-260, 1995.

ENDLER PC.; PONGRATZ W.; SMITH CW.; SCHULTE J.; SENEKOWITSCH F.; CITRO M. Non-molecular Information transfer from thyroxine to frogs. In: BASTIDE, M. (Ed.). **Signal and Images**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p.149-161, 1997.

ENDLER PC.; LUDTKE R.; HECKMANN C.; ZAUSNER C.; LASSING H.; SCHERER-PONGRATZ W; HAIDVOGL M.; FRASS M; Pretreatment with thyroxine ( $10^{-8}$  parts by weight) enhances a "curative" effect of homeopathically prepared thyroxine ( $10^{-13}$ ) on lowland frogs. **Forsch Komplementarmed Naturheilkd**, v.10, p.137-142, 2003.

ERNST E.; PITTLER MH. Efficacy of homeopathic Arnica. **Arch. Surg.**, v.133, p.1187-1190, 1998.

ETIENNE, M.S.; MANNEVILLE, J.B.; ADAMSON, P.; WILBOURN, B.; GREENWOOD, J.; COURAUD, P.O. ICAM-1-coupled cytoskeletal rearrangements and transendothelial lymphocyte migration involve intracellular calcium signaling in brain endothelial cell lines. **Journal of Immunology**, v.165, p.3375-3383, 2000.

FABRIEK BO.; DIJKSTRA CD.; VAN DEN BERG TK. The macrophage scavenger receptor CD163. **Immunobiology**, v.210, p.153-160, 2005.

FABRIEK BO.; VAN BRUGGEN R.; DENG DM.; LIGTENBERG AJ.; NAZMI K.; SCHORNAGEL K.; VLOET RP.; DIJKSTRA CD.; VAN DEN BERG TK. The macropahge scavanger receptor CD163 functions as na immune sensor for bactéria. *In press.* 2008.

FARAH, C.S.; ELAHI, S.; PANG, G.; GOTJAMANOS, T.; SEYMOUR, G.J.; CLANCY, R.L.; ASHMAN, R.B. T cells augment monocyte and neutrophil function in host resistance against oropharyngeal candidiasis. *Infection and Immunity*, v.69, p.6110-6118, 2001.

FERRARI, FS.; BONAMIN, LV. Efeitos da *Arnica montana* (6CH, 12CH e Tintura-mãe) na Reabsorção Linfática de Ratos Submetidos a Modelo de Inflamação Aguda. – **Anais XX Symposium of GIRI – 2006.** [www.giriweb.com](http://www.giriweb.com)

GENET L. Arnica - Grandes characteristiques: contusion, douleur, hipersensibilité. **Les annales Homeopathiques Française**, v.4, p.91, 1980.

GOEBELER M.; ROTH J.; TEIGELKAMP S.; SORG C. The monoclonal antibody MAC387 detects an epitope on the calcium-binding protein MRP14. **Journal of Leukocyte Biology**, v.55, p.259-261, 1994.

HALL IH; LEE KH; STARNES CO; MURAOKA O; SERMIDA Y; WADDEL TG. Antihyperlipidemic Activity of Sesquiterpene Lactones

and related Compounds. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 4, p. 91, 1980.

HALL O.; WILLIANS JR.; CHANEY SG.; GILBERT CJ.; HOLBROOK DJ.; MURAOKA O.; KIYOKAWA H.; LEE KH. Effects of Series of Helenalin Derivated on P388 Lymphocytic Leukemia Nucleic Acid and Protein Synthesis. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.74, n.3, p.250-254, 1985.

HART O., MULLEE MA., LEWITH G.; MILLER J. Double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial of homeopathic arnica C30 for pain and infection after total abdominal hysterectomy. **J. R. Soc. Med.**, v.90, n.2, p.73-78, 1997.

IALENTI A; IANARO A; MAFFIA P; SAUTEBIN L; DI ROSA M. Nitric oxide inhibits leucocyte migration in carrageenin-induced rat pleurisy. **Inflamm. Res.**, v. 49, p.411-417, 2000.

JÄGGI R; WÜRGLER U; GRANDJEAN F; WEISER M. Dual inhibition of 5-lipoxygenase/cyclooxygenase by a reconstituted homeopathic remedy; possible explanation for clinical efficacy and favourable gastrointestinal tolerability. **Inflammation Research**, v. 53, p. 150-157, 2004.

JAWARA N.; LEWITH GT.; VICKERS AJ.; MULLEE MA.; SMITH C. Homeopathic *Arnica* and *Rhus toxicodendron* for delayed onset

muscle soreness. **British Homeopathic Journal**, v.86, p.10-15, 1997.

KAROW JH.; ABT HP.; FRÖHLING M.; ACKERMANN H. Efficacy of *Arnica montana* D4 for healing of wounds after *Hallux valgus* surgery compared to diclofenac. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v.14, p.17-25, 2007.

KLASS CA; WAGNER G; LAUFER S; SOSA S; DELLA LOGGIA R; BOMME U; PAHL HL; MERFORT I. Studies on the Anti-Inflammatory Activity of Phytofarmaceuticals Prepared from *Arnica* Flowers. **Planta Med.**, v. 68, p. 385-391, 2002.

LEME JG.; BECHARA GH.; DOS SANTOS RR. A proinflammatory factor in lymphocytes. Its role in the development of acute, non-immunological inflammatory reactions. **British Journal of Experimental Pathology**, v.57, p.377-386, 1976.

LEME JG.; BECHARA GH.; SUDO LS. The proinflammatory function of lymphocytes in non-immune inflammation: effect of steroidal and non-steroidal anti-inflammatory agents. **British Journal of Experimental Pathology**, v.58, p.703-711, 1977.

LOBYSHEV VI.; SHIKHLINSKAYA RE.; RYZHIKOV BD. Experimental evidence for intrinsic luminescence of water. **Journal of Molecular Liquids**, v.82, p.73-81, 1999.

LOBYSHEV VI.; KUZNETSOVA E.; KLEPETKOVA LN. Self organization of water and heavily diluted aqueous solutions as a basis for homeopathic action. **FACT**, v.5, p.94, 2000.

LORENZ, I; SCHEIDER, E.M.; STOLZ, P.; BRACK, A.; STRUBE, J. Sensitive Flow cytometric method to test basophil activation influenced by a homeopathic histamine dilutions. **Forsch Komplementärmed Klass Naturheilkd**, v.10, p.316-324, 2003.

LYSS G.; SCHIMIDT TJ.; MERFORT I.; PAHL HL. Helenalin, an anti-inflammatory sesquiterpene lactone from *Arnica*, selectively inhibits transcription factor NF-*kappa*B. **Biol. Chem**, v.378, p.915-61, 1997.

MACEDO SB.; FERREIRA LR.; PERAZZO FF.; TAVARES CARVALHO JC. Anti-inflammatory activity of *Arnica montana* 6CH: preclinical study in animals. **Homeopathy**, v.93, p.84-87, 2004.

MARTINHO KS. ; BENTO VDB. ; BENVENGA GU. ; MARCONDES VA. ; BONAMIN LV. Hepatic cell growth models for the study of ultra high dilutions. In: **Bonamin LV (Ed)**. Signals and Images: Contributions and contradictions of high dilution research. Dordrecht, Springer, p. 119-136, 2008.

MATURANA HR. Everything is said by an observer. In : Thompson WI. Gaia : a way of knowing. Political implications of the new biology. New York : Lindisfarne Press ; 1997. Tradução de Nelson Vaz.

MICHAUD J. Action d'*Appis mell* et d'*Arnica* dans la prevention des oedemes pos-opératoires en chirurgie maxilo – faciale à propos d'une experimentation clinique sur 60 observations. In: POITEVIN, B. (Ed.). **Le devenir de l'Homeopathie – Elements de theorie et recherché.** Paris: Doin Editeurs, p.98-103, 1987.

MIRANDA AR. Water and high dilutions phenomenology: electrical characterization. Research on ultra-dilutions and the Theory of Corporeal Signifiers: the follow up. In: **Bonamin LV (Ed).** Signals and Images: Contributions and contradictions of high dilution research. Dordrecht, Springer, p.76-97, 2008.

PARENTE L; KOH MS; WILLOUGHBY DA; KITCHEN A. Studies on cell motility in inflammation. I. The chemotactic activity of experimental, immunological and non-immunological, inflammatory exudates. **Agents and Actions**, v.9, p.190-195, 1979.

PEDALINO CMV.; PERAZZO FF.; CARVALHO JCT.; MARTINHO KS.; MASSOCO CO.; BONAMIN LV. Effect of *Atropa belladonna* and *Echinacea angustifolia* in homeopathic dilution on experimental peritonitis. **Homeopathy**, v.93, p.193-198, 2004.

PINTO SAG.; BOHLAND E.; COELHO CP.; MORGULIS MSFA.; BONAMIN LV. An animal model for the study of *Chamomilla* in stress and depression: pilot study. **Homeopathy**, v.97, p.141-144, 2008.

POLAK, J.M.; NOORDEN, S.V. An introduction to immunocytochemistry: current techniques and problems. In: Oxford Science Publications. p.1-2, 1987.

RAJKUMAR R, SRIVASTAVA SK, YADAV MC, VARSHNEY VP, VARSHNEY JP, KUMAR H. Effect of a homeopathic complex on oestrus induction and hormonal profile in anoestrus cows. **Homeopathy**, v.95, p.131-135, 2006.

REBER A.; POITEVIN B.; LEROY MH.; NZOUNSANA V. Optokinetic and vestíbulo-oral reflex adjustment by GABA antagonists. **Behavioural Brain Research**, v.81, p.89-97, 1996.

REY L. Thermoluminescence of ultra-high dilutions of lithium chloride and sodium chloride. **Physica A**, v.323, p.67-74, 2003.

RIGAMONTI B. Arnica a magical remedy against any type of trauma. **Obiettivi e Documenti Veterinari**, v.16, p.67-68, 1995.

ROBLES M.; AREGULLIN M.; WEST J.; RORIGUEZ E. Recent studies on the zoopharmacognosy, pharmacology and neurotoxicology of sesquiterpene lactones. **Planta Medica**, v.61, p.199-203, 1995.

ROCHA MPS.; SOARES FM.; MARTINI LC.; BONAMIN LV. Behavior of rats treated with *Rhus toxicodendron* 200cH. **International Journal of High Dilution Research**, v.7, p.3-6, 2008.

ROSENBAUM, P. Miasmas – Saúde e enfermidades na prática clínica homeopática. In: **Roca (Ed.)**, p.277-278, 1998.

SAINTE LAUDY J; BELON P. Improvement of flow cytometric analysis of basophil activation inhibition by high histamine dilutions. A novel basophil specific marker CD 203c. **Homeopathy**, v.95, p.3-8, 2006.

SANTOS AL.; PERAZZO FF.; CARDOSO LGV.; CARVALHO JCT. In vivo study of the anti-inflammatory effect of *Rhus toxicodendron*. **Homeopathy**, v.96, p.95-101, 2007.

SATO C. Desenvolvimento de frangos de corte tratados com Timulina homeopática. Trabalho de conclusão de curso de graduação: Universidade Paulista – UNIP, Brasil, 2008.

SAUTEBIN L; IALENTI A; IANARO A; DI ROSA M. Relationship between nitric oxide and prostaglandins in carrageenin pleurisy. **Biochem. Pharmcol.**, v.55, p.1113-1117, 1998.

SHANG A, HUWILLER-MUNTENER K, NARTEY L, JUNI P, DORIG S, STERNE JAC, PEWSNER D, EGGER M. Are the clinical effects of homeopathy placebo effects? Comparative study of placebo-controlled trials of homeopathy and allopathy. **Lancet**, v.366, p.726-32, 2005.

SCHIMIDT T.; WILLUHN G.; WENDISCH D.; STEIGEL A. A 7(12) 6-trans-lactonized helemanolide lignas and inositol esters from Arnica alpina sp. attenuata. **Planta Medica**, v.59, p.598-99, 1993.

SCHIMIDT, T. J.; BRUN, R.; WILLUHN, G.; KHALID, S. M. Anti-trypanossomal Activity of Helenalin and Some Structurally Related Sesquiterpene Lactones. **Planta Med**, v. 68, p. 750-751, 2002.

SOARES FM. Atividade geral de ratos tratados com *Bryonia alba* 200CH. **Trabalho de Conclusão de curso de graduação: Universidade de Santo amaro**, Brasil; 2007.

TASMAN F.; DAGDEVIREN A.; KENDIR B.; OZCELIK B.; ATAÇ A.; ER N. Endothelial cell adhesion molecules in human dental pulp: a comparative immunohistochemical study on chronic periodontitis. **Journal of Endodontics**, v.25, p.664-667, 1999.

WHITELAND, J.L.; NICHOLLS, S.M.; SHIMELD, C.; EASTY, D.L.; WILLIAMS, N.A.; HILL, T.J. Immunohistochemical detection of T-cell subsets and other leukocytes in paraffin-embedded rat and mouse tissues with monoclonal antibodies. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v.43, p.313-320, 1995.

YILMAZ, G.; GRANGER, G.N. Cell adhesion molecules and ischemic stroke. **Neurological Research**, v.30, p.783-793, 2008.

YOUNG-SIMO, BJ; BOUDARD, F; GUELLATI, M; MEKAOUCH, M; BAYLÉ, JD; BASTIDE, M. The role of the Bursa de Fabricius and highly dilute bursin in immunoendocrine interactions in the chickens. In: M. Bastide (Ed.), **Signal and Images**. Dordrecht, Kluwer Academic Publisher. p.111-121. 1997.

## ANEXO 1



## C E R T I F I C A D O

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 011/07 CEP/ICS/UNIP, sobre o projeto de pesquisa intitulado *"Efeitos da Arnica Montana (6CH) sobre a migração de Células Inflamatórias em Ratos Submetidos à Modelo de Inflamação Aguda"*, sob a responsabilidade LEONI VILLANO BONAMIN e ANA PAULA KAWAKAMI, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo animais, conforme a Lei Estadual nº 11.977/05 que institui o Código de Proteção aos Animais do Estado de São Paulo, e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

Universidade Paulista, em SÃO PAULO-SP, aos 11 dias do mês de setembro de 2007.

*Fernanda Kaape*  
 Fernanda Kaape  
 Secretária do Comitê de Ética  
 em Pesquisa da UNIP



## ANEXO 2

## Apresentação global dos resultados

| <b>SUBGRUPO 30<br/>MINUTOS</b> | <b>Grupo Controle</b>            | <b><i>Arnica montana</i><br/>6CH</b> | <b>Dexametasona</b>              |
|--------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|
|                                | <b>Média ± Desvio<br/>Padrão</b> | <b>Média ± Desvio<br/>Padrão</b>     | <b>Média ± Desvio<br/>Padrão</b> |
| <b>Edema de pata</b>           | $0,84 \pm 0,33^a$                | $0,07 \pm 0,48$                      | $0,51 \pm 0,55$                  |
| <b>Mastócitos</b>              |                                  |                                      |                                  |
| <b>degranulados</b>            | 24%                              | 17%                                  | 16%                              |
| <b>Vasos linfáticos</b>        | $108,73 \pm 65,34^b$             | $147,32 \pm 113,71$                  | $80,13 \pm 44,64$                |
| <b>CD54</b>                    | $2 (2-6)^c$                      | $5 (3-8)$                            | $4 (3-6)$                        |
| <b>PMN</b>                     | $158,11 \pm 29,88^d$             | $172,30 \pm 21,60$                   | $175,90 \pm 32,52$               |
| <b>CD45RA</b>                  | $23,5 \pm 35,34$                 | $26,33 \pm 16,37$                    | $26,25 \pm 13,79$                |
| <b>CD18</b>                    | $62,11 \pm 24,63$                | $52,11 \pm 17,87$                    | $72,88 \pm 21,58$                |
| <b>CD163</b>                   | $37,28 \pm 6,42$                 | $33,22 \pm 9,56$                     | $32,66 \pm 8,12$                 |
| <b>MAC 387</b>                 | $46,87 \pm 7,82$                 | $48,8 \pm 10,11$                     | $50,9 \pm 8,84$                  |
| <b>CD3</b>                     | $11,11 \pm 4,04$                 | $13,8 \pm 9,39$                      | $12,2 \pm 4,13$                  |

<sup>a</sup> média ± desvio padrão; milímetros

<sup>b</sup> média ± desvio padrão; pixels por campo

<sup>c</sup> mediana e intervalo; escores atribuídos por dois observadores independentes

<sup>d</sup> média ± desvio padrão; células por campo

| <b>SUBGRUPO 180<br/>MINUTOS</b> | <b>Grupo Controle</b>            | <i>Arnica montana</i><br><b>6CH</b> | <b>Dexametasona</b>              |
|---------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
|                                 | <b>Média ± Desvio<br/>Padrão</b> | <b>Média ± Desvio<br/>Padrão</b>    | <b>Média ± Desvio<br/>Padrão</b> |
| <b>Edema de pata</b>            | 0,63 ± 0,45 <sup>a</sup>         | 0,78 ± 0,54                         | 0,89 ± 0,48                      |
| <b>Mastócitos</b>               |                                  |                                     |                                  |
| <b>degranulados</b>             | 14%                              | 20%                                 | 16%                              |
| <b>Vasos linfáticos</b>         | 101,12 ± 45,25 <sup>b</sup>      | 108,08 ± 84,33                      | 105,95 ± 63,06                   |
| <b>CD54</b>                     | 4 (2-7) <sup>c</sup>             | 4,5 (2-6)                           | 2 (2-5)                          |
| <b>PMN</b>                      | 176,33 ± 29,95 <sup>d</sup>      | 185,60 ± 17,16                      | 179,37 ± 22,67                   |
| <b>CD45RA</b>                   | 22,85 ± 17,12                    | 22,77 ± 16,20                       | 25,88 ± 20,27                    |
| <b>CD18</b>                     | 62 ± 13,68                       | 56,8 ± 23,58                        | 63,11 ± 18,82                    |
| <b>CD163</b>                    | 31,5 ± 14,84                     | 35,66 ± 10,34                       | 30,11 ± 12,45                    |
| <b>MAC 387</b>                  | 47,77 ± 8,24                     | 45,2 ± 11,53                        | 51,88 ± 13,52                    |
| <b>CD3</b>                      | 12,66 ± 7,98                     | 15,2 ± 7,50                         | 14,88 ± 5,37                     |

<sup>a</sup> média ± desvio padrão; milímetros

<sup>b</sup> média ± desvio padrão; pixels por campo

<sup>c</sup> mediana e intervalo; escores atribuídos por dois observadores independentes

<sup>d</sup> média ± desvio padrão; células por campo